

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
 United States Patent and Trademark
 Office
 Box PCT
 Washington, D.C.20231
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 10 April 2000 (10.04.00)	
International application No. PCT/JP99/04615	Applicant's or agent's file reference 99032PCT
International filing date (day/month/year) 26 August 1999 (26.08.99)	Priority date (day/month/year) 01 September 1998 (01.09.98)
Applicant KANEKO, Kazuhiro et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

15 February 2000 (15.02.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election ☒ was☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer R. Forax Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	--

mit

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
 OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
 Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

FURUYA, Kaoru
 Hamacho-Hanacho Building
 6th floor
 2-17-8, Nihonbashi-Hamacho
 Chuo-ku
 Tokyo 103-0007
 JAPON

Date of mailing (day/month/year) 03 March 2000 (03.03.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 99032PCT	
International application No. PCT/JP99/04615	International filing date (day/month/year) 26 August 1999 (26.08.99)

1. The following indications appeared on record concerning:	
<input type="checkbox"/> the applicant	<input type="checkbox"/> the inventor
<input checked="" type="checkbox"/> the agent	<input type="checkbox"/> the common representative
Name and Address 1) FURUYA, Kaoru 2) MIZOBE, Takahiko Nihonbashi TM Building 1-8-11, Nihonbashi-Horidomecho Chuo-ku, Tokyo 103-0012 Japan	State of Nationality
	State of Residence
	Telephone No. 03-3663-7808
	Facsimile No. 03-3639-0419
Teleprinter No.	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:	
<input type="checkbox"/> the person	<input type="checkbox"/> the name
<input checked="" type="checkbox"/> the address	<input type="checkbox"/> the nationality
<input type="checkbox"/> the residence	
Name and Address 1) FURUYA, Kaoru 2) MIZOBE, Takahiko Hamacho-Hanacho Building 6th floor 2-17-8, Nihonbashi-Hamacho Chuo-ku Tokyo 103-0007 Japan	State of Nationality
	State of Residence
	Telephone No. 03-3663-7808
	Facsimile No. 03-3639-0419
Teleprinter No.	
3. Further observations, if necessary:	
4. A copy of this notification has been sent to:	
<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input checked="" type="checkbox"/> the designated Offices concerned
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input type="checkbox"/> the elected Offices concerned
<input type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Shinji IGARASHI Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 99032PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP99/04615	International filing date (day/month/year) 26 August 1999 (26.08.99)	Priority date (day/month/year) 01 September 1998 (01.09.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC G01N 33/92, 33/15		
Applicant EISAI CO., LTD		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability: citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 15 February 2000 (15.02.00)	Date of completion of this report 13 April 2000 (13.04.2000)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

I. Basis of the report**1. With regard to the elements of the international application:***

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-12	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-12	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-12	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

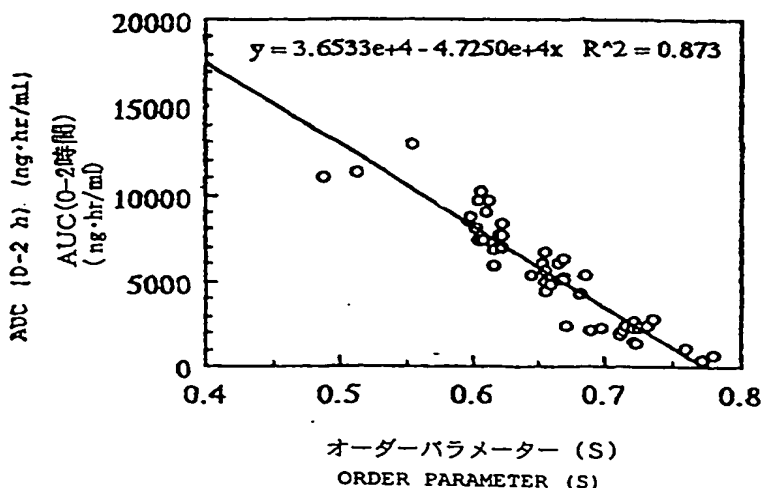
None of the documents cited in the international search report describes the measurement of membrane fluidity and/or circular polarization of lipid A analogues and the prediction of their pharmacokinetics, and these matters are not obvious to persons skilled in the art.



(51) 国際特許分類6 G01N 33/92, 33/15		A1	(11) 国際公開番号 WO00/13029
			(43) 国際公開日 2000年3月9日(09.03.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/04615		(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) エーザイ株式会社(EISAI CO., LTD.)(JP/JP) 〒112-8088 東京都文京区小石川4丁目6番10号 Tokyo, (JP)	
(22) 国際出願日 1999年8月26日(26.08.99)		(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 金子和裕(KANEKO, Kazuhiro)(JP/JP) 〒305-0045 茨城県つくば市梅園2-11-3 スカイハイツ502 Ibaraki, (JP) 渡邊知仁(WATANABE, Tomohito)(JP/JP) 〒305-0031 茨城県つくば市吾妻3-7-9 シャトーレ川中403 Ibaraki, (JP) 浅井泰行(ASAI, Yasuyuki)(JP/JP) 〒492-8301 愛知県稲沢市生出本町33番地 Aichi, (JP) 佐野善寿(SANO, Yoshihisa)(JP/JP) 〒300-0832 茨城県土浦市桜ヶ丘町20-16 Ibaraki, (JP)	
(30) 優先権データ 特願平10/246862 1998年9月1日(01.09.98) JP		(74) 代理人 古谷 馨, 外(FURUYA, Kaoru et al.) 〒103-0012 東京都中央区日本橋堀留町1-8-11 日本橋TMビル Tokyo, (JP)	
		(81) 指定国 JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)	
		添付公開書類 国際調査報告書	

(54)Title: METHOD FOR EVALUATING LIPID A ANALOG-CONTAINING INJECTIONS

(54)発明の名称 リピッドA類縁体含有注射剤の評価方法



(57) Abstract

A method for evaluating injections containing lipid A analogs and a process for producing these injections. With respect to injection preparations containing lipid A analogs or pharmacologically acceptable salts thereof, namely, a method for predicting the dynamics of the lipid A analogs *in vivo*, a method for evaluating the same, a method for evaluating the qualities of the injections or a process for producing the injections, each characterized by measuring the membrane fluidity and/or circular polarization.

明細書

リピッドA類縁体含有注射剤の評価方法及び製造方法

発明の属する技術分野

本発明は、リピッドA類縁体含有注射剤の体内動態の予測方法と評価方法、更には、一定の体内動態を示すことを保証する注射剤の品質評価方法及び製造方法に関する。

従来技術

リピッドAは、リポポリサッカライド（以下LPSと称する）の活性発現中心であり、マクロファージ刺激作用、抗腫瘍作用、発熱作用などさまざまな生物活性を有することが知られている（高田春比古、小谷尚三；蛋白質・核酸・酵素、31（4）、361（1986））。

さらに、近年は、リピッドA類縁体が種々合成され、その生物活性が調べられているが（小川祐示他；代謝、26（5）、415（1989））、糖脂質構造を有するリピッドA類縁体の多くは、水難溶性であり注射剤化が困難であった。

注射剤化の為に、透明性の高い水溶液を得るための可溶化剤としては、トリエチルアミン、牛血清アルブミン、脂質などの添加（Y.B.Kim,et al,Eur.J.Biochem.31,230(1972)及び R.B.Ramsey,et al,Blood,56,307(1980)、及び J.Dijkstra,et al.,J.Immunol.,138,2663(1987)）、塩基性アミノ酸やポリアミンの利用（特開平4-198192号公報）などが報告されている。

また、レシチンなどの脂質を水に分散させ、リポソーム等の会合体を形成させる為に、中性領域の緩衝液に脂質を入れて加熱し、超音波照射する方法が知られている。

我々は、特開平5-194470号公報、WO96/39411号公報によって開示される方法で製造されたリピッドA類縁体またはその薬理学的に許容できる塩を、アルカリ性水溶液に溶解し、次いで緩衝液を添加することにより、直径

30 nm以下の会合体を含有する透明性の高い注射用製剤を調製した。

しかし、この注射用製剤をラットやビーグル犬等の生体に投与した際には、原薬や製剤ロットの違いによりリピッドA類縁体の血中薬物濃度が大きくばらつく問題があった。これは、この注射用製剤の溶液中における薬物（脂質）の会合状態が、一定でないためである。

一般に、溶液中における脂質の会合状態を評価する手段としては、電子顕微鏡による外観評価、レーザー回折式粒度分布測定装置による粒度分布の評価、臨界ミセル濃度や表面張力測定等の物性値からの考察などの方法が、実施されている。

しかし、本願発明に係る評価法として使用した円偏光二色性分光法及び/又は膜流動性評価法に関しては、報告例は少ない。

即ち、円偏光二色性分光法（以下CD法と称する）は、左右円偏光に対する光学活性物質の屈折率および吸光度の差を反映して測定されるものであり、一般的には、ペプチド、蛋白質のコンフォメーション解析や低分子化合物の光学活性分析に繁用されているが、脂質関連物質のCD法での解析はほとんど行われていなかった。報告では、リポソーム膜内での脂質の動的な温度依存性の変化をCDスペクトル変化の解析により検討した例（特開昭62-252795）、CD法は水中の脂質粒子の特徴の評価の為に有用な手法であり、操作上極めて簡便な評価法であると同時に、希薄濃度で膜内の動的な状態変化を測定することが可能であるとした報告例（N.Nakashima et al, CHEM. LET., 1503, 10(1985)）、プロスタグランジンE₁の種々リポソーム処方による会合体特性と溶出特性の相関を検討し、その評価法の一つにCD法を用いた例（Sharon M.K. et al, Biochim. Biophys. Acta, 1327, 97(1997)）などがあるにすぎない。

一方、膜流動性（膜の堅牢さ）の評価法には、蛍光プローブ法、電子スピン共鳴（ESR）法、核磁気共鳴（NMR）法などが知られている（ロバートB. ゲニス；生体膜 p146、（1992）シュプリンガーフェアラーク東京）。この中で、蛍光プローブ法は、リン脂質の2分子膜構造の膜流動性を評価する方法として、脂質の膜内にジフェニールヘキサトリエン（以下DPHと称する）などの蛍光プローブを混入し、偏向している入射光を照射した時に発する蛍光の偏向

度を測定することにより、蛍光物質の近傍の膜の状態を観察する方法であり、リピッドA類縁体に適用した報告例がある (Braudenburg K et al; Biochim.Biophys.Acta, 225,775(1984))。蛍光プローブ法では、脂質試料から発する蛍光の鉛直偏向成分と水平偏向成分を別個に測定することにより、蛍光偏向度 (P : 範囲 0 ~ 0.5) 及び/又は蛍光異方性 (r : 範囲 0 ~ 0.4) 及び/又はオーダーパラメーター (S : 範囲 0 ~ 1.0) を算出できる (寺田弘、吉村哲郎 ; ライフサイエンスにおけるリポゾーム (1992)、シュプリンガーフェアラーク東京)。ここで、オーダーパラメーター (S) は、0に近いほど膜流動性が大きく、1.0に近いほど膜流動性は小さいことを意味している。

しかし、リピッドA類縁体において、薬物の溶液中における会合状態を測定・評価することにより、体内動態との相関性の観点からリピッドA類縁体の体内動態を明確に予測または評価した例はない。また、溶液中における薬物 (脂質) の会合状態の観点から、リピッドA類縁体の体内動態が制御された注射用製剤の製造法または一定の体内動態を保証する品質保証法の報告例もない。

リピッドA類縁体またはその薬理学的に許容できる塩を、アルカリ性水溶液に溶解し、次いで緩衝液を添加することにより、直径 30 nm 以下の会合体を含有する注射用製剤を調製することは可能である。この注射用製剤においては、リピッドA類縁体またはその薬理学的に許容できる塩は、脂質二分子膜小胞体またはミセル構造を有している。即ち、水溶液とした時に澄明性が高く、pHが注射剤として好ましい範囲であり、安定性も良好であるリピッドA類縁体の注射剤が製造できる。

しかし、その注射用製剤をラットやビーグル犬に投与した際には、原薬や製剤間のロットの差異により、血中濃度が大きくばらつく問題があった。これは、原薬や製剤間のロットの差により、リピッドA類縁体の溶液中での存在状態、即ち、直径 30 nm 以下の脂質二分子膜小胞体またはミセルの会合体構造が一様でなかった為である。従って、リピッドA類縁体の実用に供しうる注射剤、即ち、原薬や製剤のロットに依存することなく、血中濃度に代表される体内動態の変動の少ない注射剤及びその体内動態を予測する評価方法が渴望されている。

発明の開示

以上のような状況に鑑み、本発明者らは、リピッドA類縁体を含有する澄明性が高く、安定性も良好である上に、体内動態が原薬や製剤のロットに依存することなく変動の少ない注射剤並びにそれらの体内動態の予測評価法を探索すべく鋭意研究を行った。その結果、以下に示す構成により所期の目的を達成できることを見だし、本発明を完成した。

本発明は、リピッドA類縁体またはその薬理学的に許容できる塩を含有する注射用製剤において、溶液中での膜流動性及び/又は円偏光性を測定することを特徴とするリピッドA類縁体の体内動態の予測方法である。

本発明は、また、リピッドA類縁体またはその薬理学的に許容できる塩を含有する注射用製剤において、溶液中での膜流動性及び/又は円偏光性を測定することを特徴とするリピッドA類縁体の体内動態の評価方法である。

また、本発明は、リピッドA類縁体またはその薬理学的に許容できる塩を含有する注射用製剤において、溶液中での膜流動性及び/又は円偏光性を測定し評価することにより、生体内でリピッドA類縁体が一定の体内動態を示すことを保証するリピッドA類縁体含有注射剤の品質評価法である。

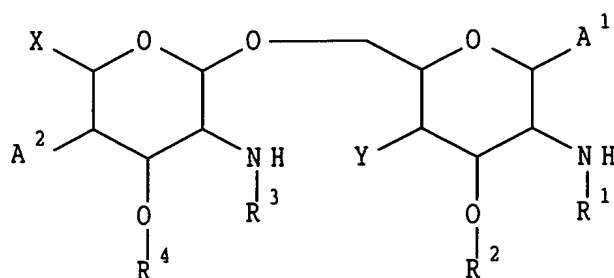
さらに本発明は、リピッドA類縁体またはその薬理学的に許容できる塩を含有する注射用製剤の製造工程において、溶液中での膜流動性及び/又は円偏光性の測定を必須とする注射用製剤の製造方法である。

本発明の体内動態の予測方法は、注射用製剤の評価、一定の体内動態を示す注射用製剤を得るための品質評価および注射用製剤の製造工程において用いることができる。

本発明によると、リピッドA類縁体またはその薬理学的に許容できる塩（以下、単に、リピッドA類縁体と称する）を透明で安定な体内動態が保証された注射用製剤とすることができるが、これが本発明の目的である。また、本発明においては、リピッドA類縁体を含有する注射用製剤において、膜流動性及び/又は円偏光性を測定することによる体内動態の予測方法、評価方法を提供することができるとともに、リピッドA類縁体が一定の体内動態を示すことを保証するリピッド

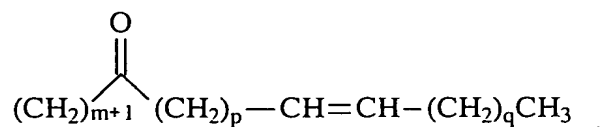
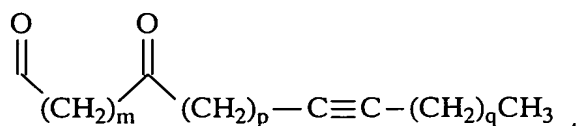
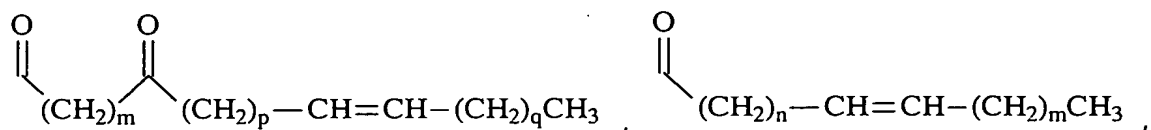
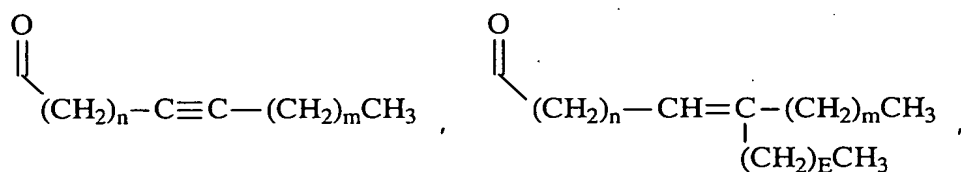
A類縁体含有注射剤の品質評価方法を提供することができるが、これもまた、本発明の目的のひとつである。

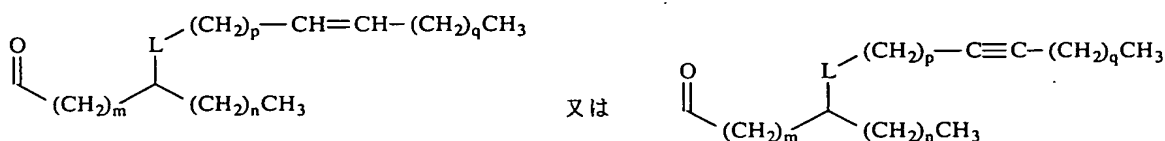
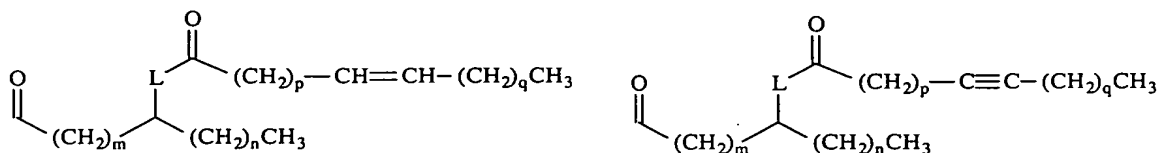
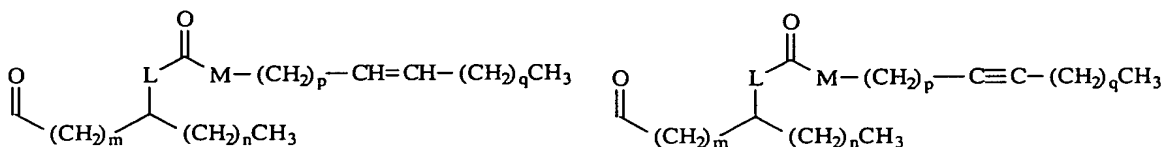
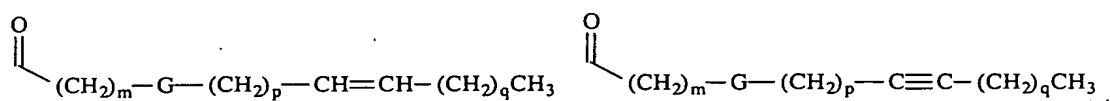
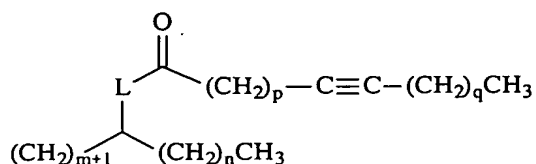
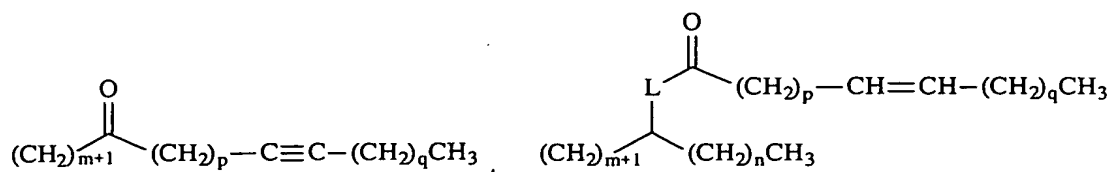
本発明によるリピッドA類縁体は次の化学構造式を有し、例えば特開平5-194470号公報またはWO96/39411号公報によって開示される方法で製造することができる。



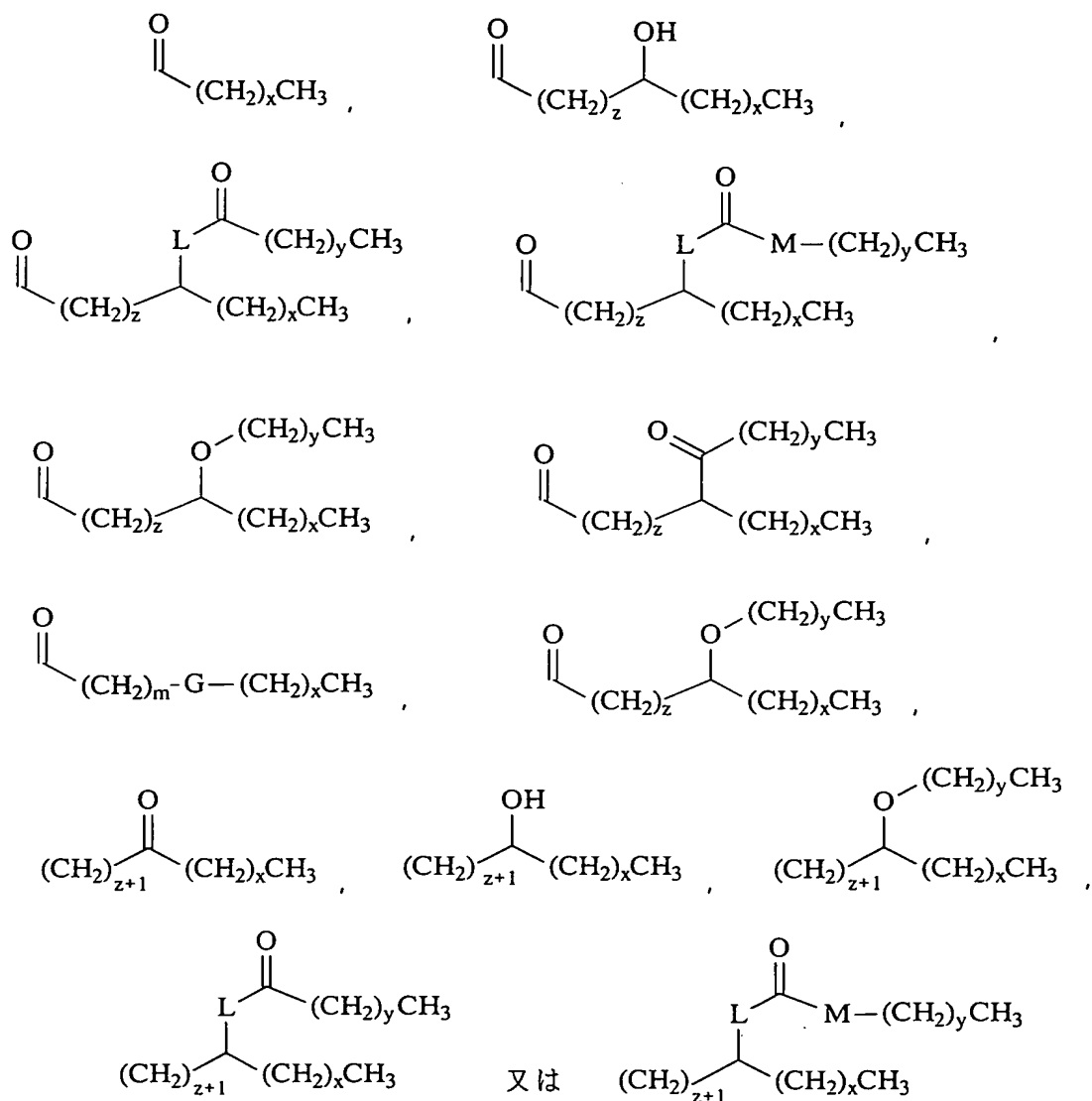
(I)

式中、R¹、R²、R³又はR⁴の少なくとも一つは、

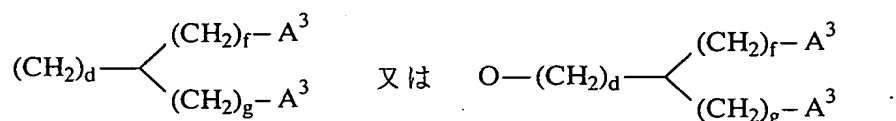
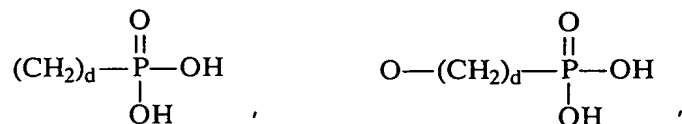
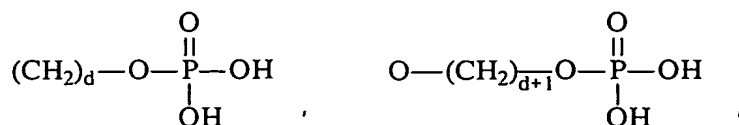




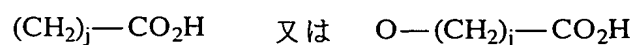
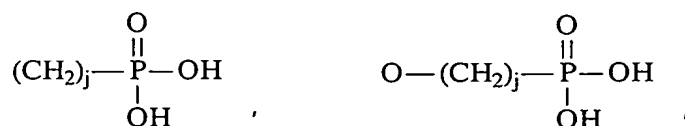
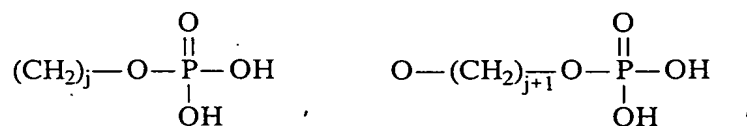
(式中、各LはO、N又はCであり；各MはO又はNであり；各Eは、独立して0から14までの整数であり；各Gは、独立してN、O、S、SO又はSO₂であり；各mは、独立して0から14までの整数であり；各nは、独立して、0から14までの整数であり；各pは独立して0から10までの整数であり；各qは、独立して0から10までの整数である)であり；
残りのR¹、R²、R³及びR⁴の各々は、独立して、



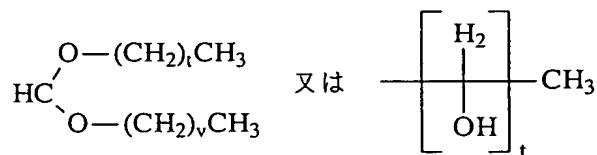
(式中、各LはO、N又はCであり；各MはO又はNであり；各xは、独立して、0から14までの整数であり；各yは、独立して、0から14までの整数であり；各zは、独立して0から10までの整数であり；各Gは、独立して、N、O、S、SO又はSO₂である)であり；
 各A¹とA²は、独立して、H、OH、OCH₃、



(式中、各 d は、独立して、0 から 5 までの整数であり；各 f は、独立して、0 から 5 までの整数であり；各 g は、独立して、0 から 5 までの整数であり；各 A^3 は、独立して、



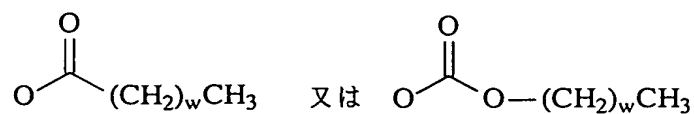
(式中、各 j は、独立して、0 から 14 までの整数である) であり；
 X は、 H , $(\text{CH}_2)_t\text{CH}_3$, $(\text{CH}_2)_t\text{OH}$, $(\text{CH}_2)_t\text{O}(\text{CH}_2)_v\text{CH}_3$, $(\text{CH}_2)_t\text{OPO}(\text{OH})_2$, $(\text{CH}_2)_t-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_v\text{CH}_3$, $(\text{CH}_2)_t\text{-O-R}^5$,



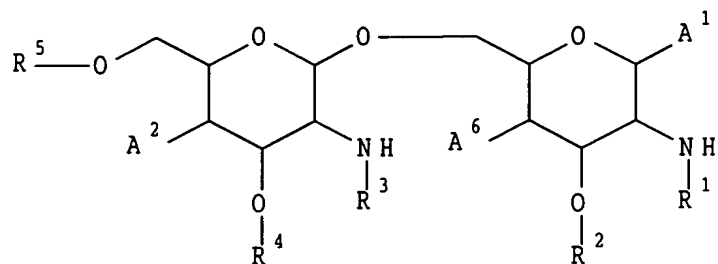
(式中、各 t と v は、それぞれ独立して、0 から 14 までの整数であり；

R^5 は $\text{R}^1 \sim \text{R}^4$ に対する上記定義のいずれかである) であり；

Yは、H, OH, $O(CH_2)_wCH_3$, ハロゲン原子、

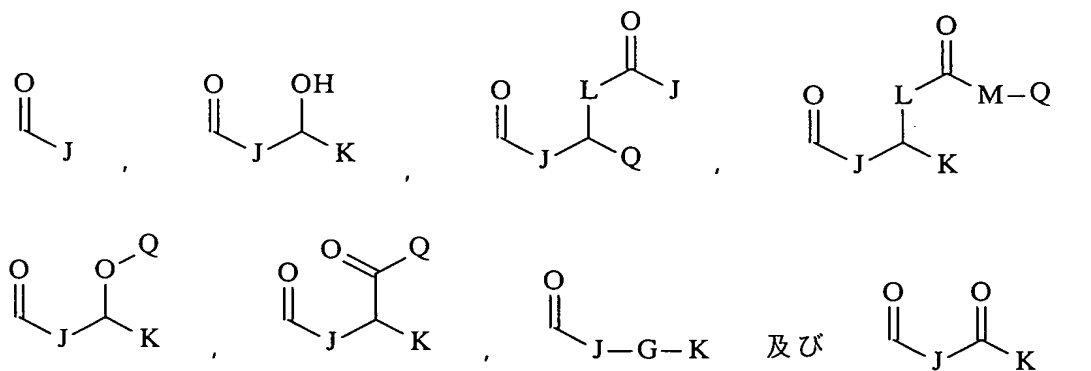


(式中、wは0から14までの整数である)である。



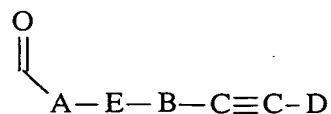
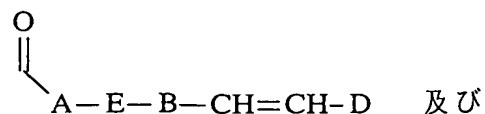
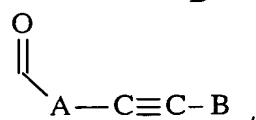
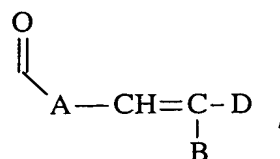
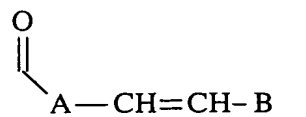
(II)

式中 R^1 は



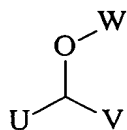
(式中、J, K及びQは、それぞれ直鎖又は分枝の炭素数1～15のアルキル基であり、LはO, NH_2 又は CH_2 であり、MはO又はNHであり、GはNH, O, S, SO又は SO_2 である)から成る群から選ばれる基であり；
 R^2 は直鎖又は分枝状の炭素数5～15のアルキル基であり；

R³は、



(式中、Eは、N、O、S、SO又はSO₂であり、A、B及びDは、それぞれ直鎖又は分枝の炭素数1～15のアルキル基である) からなる群から選ばれる基であり；

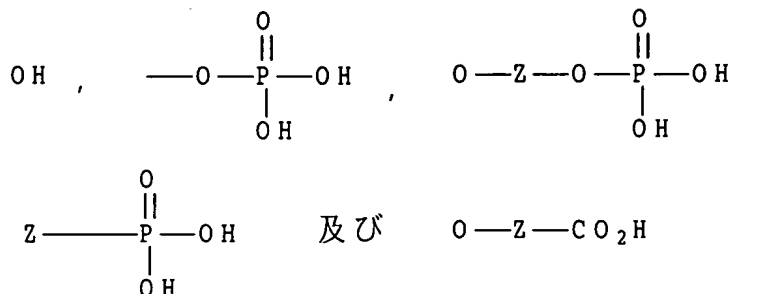
R⁴は直鎖又は分枝の炭素数4～20のアルキル基、及び



(式中、U及びVは、それぞれ直鎖又は分枝の炭素数2～15のアルキル基であり、Wは水素原子、あるいは直鎖又は分枝の炭素数1～5のアルキル基である) からなる群から選ばれる基であり；

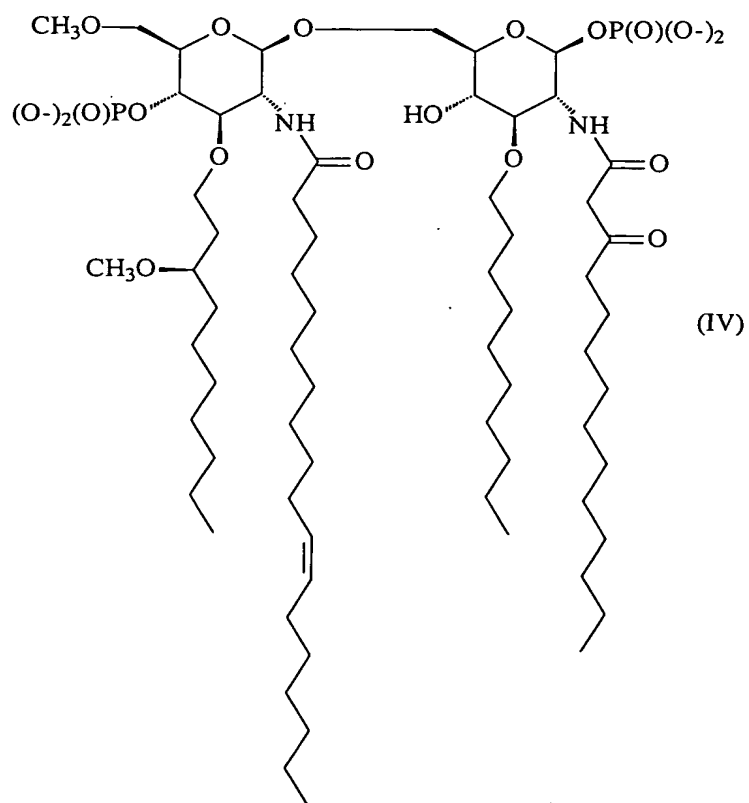
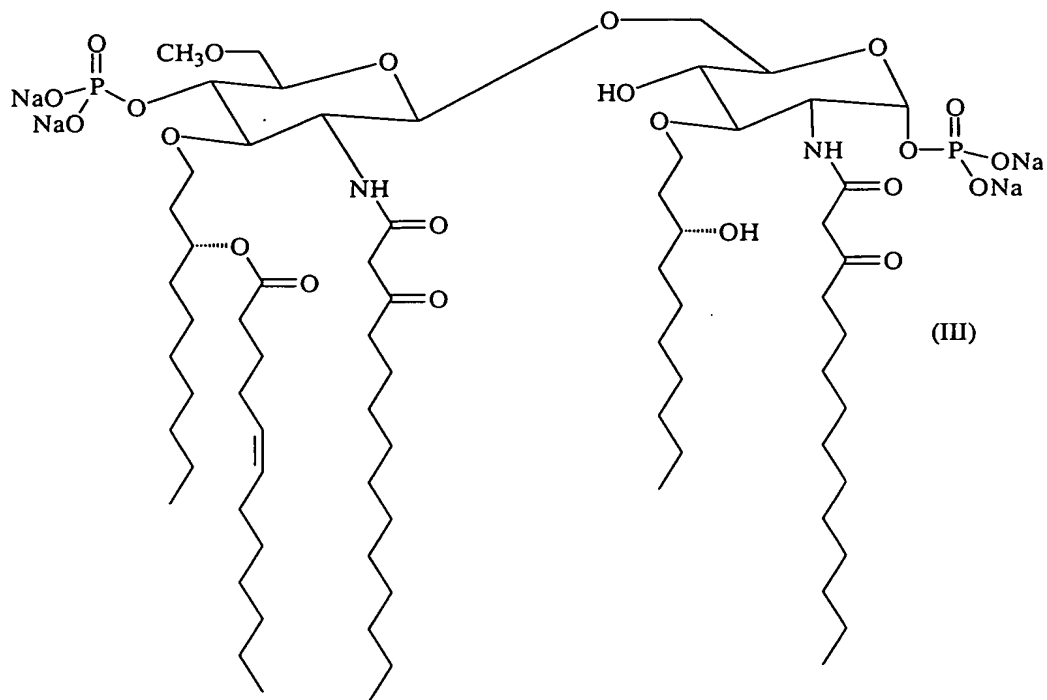
R⁵は水素原子、J'、-J'-OH、-J'-O-K'、-J'-O-K'-OH及び-J'-O-PO(OH)₂(式中J'及びK'は、それぞれ直鎖又は分枝の炭素数1～5のアルキル基である) から選ばれる基であり；

A^1 及び A^2 は、それぞれ独立して、



(式中、Zは直鎖又は分枝の炭素数1～10のアルキル基である)からなる群から選ばれる基である。

本発明において、好ましいリピッドA類縁体として、6-O-[2-デオキシ-6-O-メチル-4-O-フォスフォノ-3-O-[(R)-3-Z-ドデク-5-エノイルオキシデシル]-2-[3-オキソ-テトラデカノイルアミド]-β-D-フォスフォノ-α-D-グルコピラノース]四ナトリウム、α-D-グルコピラノース,3-O-デシル-2-デオキシ-6-O-[2-デオキシ-3-O-(3-メトキシデシル)-6-O-メチル-2-[(1-オキソ-11-オクタデセニル)アミノ]-4-O-フォスフォノ-β-D-グルコピラノシル]-2-[(1,3-ジオキソテトラデシル)アミノ]-,1-(ディハイドロジェンフォスフェイト),ジナトリウム[6(2Z,3R)]、及びα-D-グルコピラノース,3-O-デシル-2-デオキシ-6-O-[2-デオキシ-3-O-(3-メトキシデシル)-6-O-メチル-2-[(1-オキソ-11-オクタデセニル)アミノ]-4-O-フォスフォノ-β-D-グルコピラノシル]-2-[(1,3-ジオキソテトラデシル)アミノ]-,1-(ディハイドロジェンフォスフェイト),テトラナトリウム[6(2Z,3R)]を挙げることができる。これらの化学構造式は次の式(III)及び(IV)で表わされる。



一般に、リン脂質のリポソームは、スカベンジャーレセプターを介して肝臓などの網内系に取り込まれることにより、その血中濃度変動に大きな影響を受けることが知られている。また、リポソームなどのアニオン性高分子を認識し取り込むスカベンジャーレセプターのメカニズムについての研究では、膜流動性（膜の堅牢さ）、表面荷電及び粒径が、スカベンジャーレセプターの認識の上で重要な役割を果たすことも知られている（寺田弘、吉村哲郎；ライフサイエンスにおけるリポソーム p.326（1992）シュプリンガーフェアラーク東京）。

しかし、リピッドA類縁体含有製剤において、体内動態制御の観点から、膜の物理化学的性質を評価した例は、従来は、なかった。

本発明では、リピッドA類縁体をアルカリ性水溶液に溶解し、次いで緩衝液を添加して製する直径30 nm以下の会合体を含有する注射用製剤を調製する製造工程において、その膜流動性と円偏光二色性の測定・評価により、リピッドA類縁体含有注射剤の体内動態プロファイルを制御できることを明らかにした。

即ち、DPHを使用した注射用製剤中の粒子の膜流動性は、血中濃度プロファイルに密接に関係があり、製剤を投与した際には、膜流動性の大きい製剤（膜が柔らかい製剤）ほど血中からの消失は遅く（AUCは大きく）、膜流動性の小さい製剤（膜が硬い製剤）ほど血中からの消失は速く（AUCは小さく）なる。これは、膜流動性は、リピッドA含有注射剤を投与後の薬剤の生体内動態に影響を及ぼし、膜流動性が大きいほど、スカベンジャーレセプターにトラップされにくく肝臓などの食細胞に取り込まれにくくなり、循環血液中からのリピッドAの消失が遅くなるからである。また、CDスペクトルの変化と体内動態の変動に相関があることも明らかにした。

本発明は、リピッドA類縁体を含有する注射用製剤において、血中からの消失の速い処方と遅い処方間では、溶液中での膜流動性及び円偏光二色性が明確に異なることを用いて、膜流動性及び/又は円偏光性を測定することにより、良好な体内動態の保証された注射用製剤の製造を可能とするものである。また、リピッドA類縁体を含有する注射用製剤において、膜流動性及び/又は円偏光性を測定することによる体内動態の予測方法、評価方法または一定の体内動態を示すこと

を保証する品質評価法の提供も可能とするものである。

本発明においては、リピッドA類縁体をアルカリ性水溶液に溶解し、次いで緩衝液を添加すると共に、溶液中での膜流動性及び/又は円偏光性を測定することにより、体内動態の制御された直径30 nm以下の会合体を含有する透明性の高い注射用製剤を調製することができる。この発明において用いる注射用製剤の膜流動性測定は、蛍光プローブ法によるものであり、リン脂質の2分子膜構造の膜流動性を評価する方法である。即ち、脂質の膜内に蛍光プローブを混入し、偏向している入射光を照射した時に発する蛍光の偏光度を測定することにより、蛍光物質の近傍の膜の状態を観察する方法である。本発明における膜流動性評価のパラメーターとしては、蛍光偏向度（P：範囲0～0.5）及び蛍光異方性（r：範囲0～0.4）及びオーダーパラメーター（S：範囲0～1.0）から選ばれる1種類以上のいずれを用いても良い。また、使用する蛍光プローブは、安定な蛍光を発するものであればいずれでも良く、例えばジフェニールヘキサトリエン（DPH）、カルボキシフルオレセイン、カルセイン、ナイルレッド、ピレン、ペリレンなどが挙げられる。

ここで、例えば、オーダーパラメーター（S）は、0に近いほど膜流動性が大きく、1.0に近いほど膜流動性は小さいことを意味している。尚、式（III）及び（IV）で表わされるリピッドA類縁体のオーダーパラメーター（S）は、通常0.05～0.7であり、好ましくは0.1～0.6であり、更に好ましくは0.1～0.5である。

また、本発明において用いる注射用製剤の円偏光性評価（CD法）は、リピッドA類縁体の体内動態制御及び予測法として有用な方法であり、多数の注射用製剤のCDスペクトルを評価して、CD強度の差が大きい波長を選択することが望ましい。尚、式（III）及び（IV）で表わされるリピッドA類縁体のCD法における測定波長は、通常260～320 nmであり、好ましくは270～310 nmであり、更に好ましくは280～300 nmである。

本発明におけるアルカリ性水溶液としては、水酸化ナトリウム、水酸化カリウムなどのアルカリ金属の水酸化物を使用できるが、好ましくは、水酸化ナトリウムである。その濃度は通常、0.0001M～0.1Mであり、好ましくは0.0005M～0.01

Mであり、より好ましくは 0.001M ~ 0.01M である。

本発明においては、リピッド A 類縁体にアルカリ性水溶液を添加後、加温することができるが、加温温度はリピッド A 類縁体またはその薬理学的に許容できる塩の相転移温度以上であればよく、通常 30℃ ~ 60℃ であり、より好ましくは 45℃ ~ 55℃ である。攪拌時間は通常 10 分 ~ 3 時間である。攪拌は、通常用いられる装置により行うことができる。加温アルカリ性水溶液に溶解する場合は、あらかじめ加温したアルカリ性水溶液にリピッド A 類縁体を添加してもよいし、またはアルカリ性水溶液にリピッド A を添加後、加温してもよい。本発明において、加温する目的は、リピッド A 類縁体の相転移温度以上にすることにより、リピッド A 類縁体の水和を促進して分散性を向上させ、よって短時間の攪拌により澄明な溶液を得るためである。

ただし、式 (IV) で表わされるリピッド A 類縁体においては、加温しても良いし、室温で 10 分 ~ 1.5 時間の攪拌をしても良い。

また、本発明に用いる緩衝液の成分は、リン酸塩、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン、クエン酸塩またはグリシンなどを用いることができる。緩衝液の濃度は、通常、1mM ~ 20mM である。最終のリピッド A 類縁体水溶液の pH は、好ましくは 4 ~ 9、より好ましくは 6 ~ 8、さらに好ましくは 6.8 ~ 8 である。最終の pH は緩衝液を加えた後、さらに水酸化ナトリウム溶液や塩酸溶液等を添加することによって調製することができる。

緩衝液には、必要に応じて、糖類及び/又はアミノ酸を添加すると、より好ましい結果を得ることができる。この場合、添加する糖類及び/またはアミノ酸は 1 種類でもよく、2 種類以上添加してもさしつかえない。使用できる糖類としては、乳糖（ラクトース）、ソルビトール、グルコース、トレハロース、マンニトール、デキストラン等を挙げることができ、また、アミノ酸の例としては、グリシン等の中性アミノ酸、アスパラギン酸等の酸性アミノ酸、アルギニン等の塩基性アミノ酸を挙げることができる。

本発明においては、更に、得られたリピッド A 類縁体水溶液を通常用いられる手段により凍結乾燥製剤とすることができる。すなわち、リピッド A 類縁体を、

アルカリ性水溶液に溶解し、必要に応じてさらに加温攪拌し、次いで緩衝液を添加してpHを調製し、滅菌濾過後、バイアル瓶等に充填し凍結・乾燥して凍結乾燥製剤とすることができる。

本発明にかかる注射用製剤を水溶液として供した場合の浸透圧比は、ヒトに投与するに適した値とすることが望ましく、通常は1前後である。

次に、注射用製剤の膜流動性、円偏光性（CD法）の測定法及び製剤投与後のラット体内動態評価法の一例を以下に示す。

注射用製剤の膜流動性の測定法

蛍光プローブ法を用いて、蛍光偏向度（P）及び/又は蛍光異方性（r）及び/又はオーダーパラメーター（S）により評価を行う。

最初に、リピッドA類縁体を含有する注射用製剤として、濃度0.5～0.6mg/mlの溶解液を調製する（1.5～1.6mg/バイアルの凍結乾燥製剤の場合は、蒸留水3mlを添加して調製する）。次に、DPH 1.5mgをTHF 10mlに溶解させた蛍光プローブ溶液4μlを添加し、十分に混合後、50℃で1時間の放置をする。次に、室温まで冷却後に、P及び/又はrを蛍光分光光度計で測定する。尚、蛍光分光光度計F-450型（日立製作所）の測定条件は、励起波長＝360nm、発光波長＝428nm、加電圧＝700V、測定温度＝25℃、スリット幅＝5nmとした。またオーダーパラメーター（S）は、 $S = (r/0.398)^{1/2}$ で算出した。

尚、Sは、0に近いほど膜流動性は大きく（膜は柔らかく）、1に近いほど膜流動性は小さい（膜は硬い）と判断できる。

製剤の円偏光性（CD法）の測定法

リピッドA類縁体を含有する注射用製剤として、濃度0.5～0.6mg/mlの溶解液を調製する（1.5～1.6mg/バイアルの凍結乾燥製剤の場合は、蒸留水3mlを添加して調製する）。これを、スペクトロポーラロメーターJ720WI型（日本分光）でCD強度を評価する。測定条件は、波長＝200～500nm（固定波長使用時は280nm）、測定温度＝室温、セルの長さ＝1cm、スキンスピード＝20nm/分、積算回数＝5回とした。

製剤投与後のラット体内動態の評価法

製剤の体内動態プロファイルは、血中薬物濃度－時間曲線から得られる曲線下面積（以下AUCと称する）を指標として判断される。

最初に、リピッドA類縁体を含む注射用製剤として、注射用蒸留水を加えて濃度 0.6mg/ml の溶液を調製する。この溶液を、1ml/Kg の用量で雄性SDラットに大腿部静脈より投与（0.6mg/Kg）し、投与前および投与後 2, 5, 15, 30, 60, 120 分後に、各々 0.25ml の採血を行った。得られた血液を遠心分離し血漿を得た後に、この血漿中に含まれるリピッドA類縁体を液－液抽出し、ADAM試薬（フナコシ薬品）による蛍光ラベルを行った。さらに、固層抽出を行った後に、高速液体クロマトグラフィーで蛍光検出法により、血漿中リピッドA類縁体の濃度を測定した。尚、AUCは、0～120分の血中濃度推移から算出した。

本発明によると、リピッドA類縁体を透明で安定な体内動態が制御された注射用製剤とすることが可能であり、また、注射用製剤の体内動態の予測法、評価方法又は、一定の体内動態を示すことを保証するリピッドA類縁体含有注射剤の品質評価法を提供することができる。その効果例を以下に示す。

図面の簡単な説明

図1は、式（IV）で示されるリピッドA類縁体含有注射剤のラット投与(0.6mg/kg) 時の血中濃度推移を示すグラフである。

図2は、式（IV）で示されるリピッドA類縁体含有注射剤のCDスペクトル（円偏光二色性分光法評価によるスペクトル）を示すグラフである。

図3は、式（IV）で示されるリピッドA類縁体含有注射剤のCD強度とAUC（ラット投与時）の相関性を示すグラフである。

図4は、式（IV）で示されるリピッドA類縁体含有注射剤のオーダーパラメーター（S）とAUC（ラット投与時）の相関性を示すグラフである。

図5は、式（IV）で示されるリピッドA類縁体含有注射剤のCD強度とオーダーパラメーター（S）の相関性を示すグラフである。

図6は、式（III）で示されるリピッドA類縁体含有注射剤のオーダーパラメー

ター（S）とAUC（ラット投与時）の相関性を示すグラフである。

図7は、式（III）で示されるリピッドA類縁体含有注射剤の平均粒径とAUC（ラット投与時）の相関性を示すグラフである。

図8は、式（IV）で示されるリピッドA類縁体含有注射剤の溶解工程における水酸化ナトリウム濃度とAUC（ラット投与時）の相関性を示すグラフである。

実験例1

本願発明に係る体内動態プロファイル（AUC）の異なる製剤の膜流動性と円偏光二色性評価

1）クリアランスの小さい注射用製剤を以下の方法で調製した。50mL ガラス製ビーカーに、式（IV）で示されるリピッドA類縁体 32.47mg を秤量し、これに 7.5mL の 0.01M-NaOH を加えた後、室温で 60 分間スターラーバー（長さ=2cm）で攪拌した。次に、25mL の乳糖・リン酸緩衝液（精製水 25mL 中に乳糖 1 水和物を 500mg、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を 2.25mg、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ を 1.75mg 溶解させた水溶液）を加え、スターラーバーにて 5 分間攪拌後、50mL メスフラスコに全量を移し、注射用蒸留水を加えて 50mL にメスアップした。

2）クリアランスの大きい注射用製剤を以下の方法で調製した。50mL ガラス製ビーカーに、式（IV）で示されるリピッドA類縁体を 32.97mg 秤量し、これに 0.25mL の 0.01M-NaOH と 7.25mL の注射用蒸留水を加えて混和後、室温で 60 分間スターラーバー（長さ= 2cm）で攪拌した。次に、25mL の乳糖・リン酸緩衝液（精製水 25mL 中に乳糖 1 水和物を 500mg、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を 2.25mg、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ を 1.75mg 溶解させた水溶液）を加え、スターラーバーにて 5 分間攪拌後、50mL メスフラスコに全量を移した。次に、7.45mL の 0.01M-NaOH を加えて混和し、更に 0.01M-NaOH を加えて pH を 7.4 に調整した後、注射用蒸留水を加えて 50mL にメスアップした。

このクリアランスの小さな処方 1）と大きな処方 2）の 2 種類の注射用製剤処方について、その AUC と膜流動性及び円偏光二色性との相関について評価した。

図-1に示されるように、リピッドA類縁体含有の注射用製剤のラット血中濃度

推移は、クリアランスの小さな注射用製剤と大きな注射用製剤では、大きく異なっていた。また、その膜流動性を示すオーダーパラメーター（S）は、クリアランスの小さな注射用製剤では 0.499、クリアランスの大きな注射用製剤では 0.624 であり、有意な差が認められた。

さらに、円偏光二色性（CD法）によるCD強度は、図2に示されるように、波長280 nmにおいてCD強度の明確な差異が認められた。以上から、本願発明に係るリピッドA類縁体を含有する注射用製剤において、その体内動態の変動を評価する上で、膜流動性及び/又は円偏光二色性評価が有用であることは、明らかである。

実験例2

本願発明に係る注射用製剤の膜流動性及び/又は円偏光二色性の測定・評価とAUCとの相関性

式（IV）で示されるリピッドA類縁体を含有する注射用製剤を10ロット調製し、そのCD強度（波長＝280 nm）及び/又はオーダーパラメーター（S）とラット静脈内投与時のAUCの相関性を評価した。その結果、図3に示すように、ラットのAUCとCD強度の間には良好な正の相関があり、CD強度が大きいほど製剤ほどAUCの上昇が認められた。また、図4に示すように、ラットのAUCとオーダーパラメーター（S）の間には良好な負の相関があり、オーダーパラメーター（S）が小さい（0に近い）製剤ほどAUCの上昇が認められた。更に、図5に示すように、注射用製剤のCD強度（波長＝280 nm）とオーダーパラメーター（S）の間には良好な負の相関があり、CD強度が大きくなるにつれてオーダーパラメーター（S）が小さく（0に近く）なった。

一方、式（III）で示されるリピッドA類縁体を含有する注射用製剤についても数10ロットを調製し評価した結果、図6に示すようにラットのAUCとオーダーパラメーター（S）の間には同様に負の相関が認められ、その相関係数は0.873であった。また、ラットのAUCと注射用製剤の平均粒径との関係に於いては、平均粒径10～20 nmの範囲でAUCの変動が大きく、明確な相関性は認められず（図7）、体内動態の予測評価法としては不十分であった。

以上から、本願発明に係る注射用製剤の膜流動性及び/又は円偏光二色性評価に対する薬物速度論的プロファイル（AUC）の良好な相関性が証明された。即ち、膜流動性（オーダーパラメーター（S））と円偏光性（CD）は、リピッドA類縁体含有注射用製剤の体内動態の予測評価法として、十分に有効であることは明らかである。また、膜流動性及び/又は円偏光性による溶液中での会合状態の評価を特徴とする体内動態が保証された注射用製剤の調製が可能となる。即ち、リピッドA類縁体を含有する注射用製剤について、オーダーパラメーター（S）及び/又は円偏光性（CD）の値を測定することにより、AUCが推測可能となるのである。従って、本発明は産業上、利用することができる有用な発明である。

実施例

以下に実施例を挙げ本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるわけではない。

下記に示す実施例1～10は、式（IV）で示されるリピッドA類縁体を含有する注射用製剤を調製する際の溶解工程において、使用する水酸化ナトリウム（NaOH）濃度を変化させて調製した水性注射剤である。表1に、各実施例製剤のCD強度、オーダーパラメーター（S）とラット投与時のAUC値を示した。また、図8に、各実施例製剤での上記溶解工程に使用した水酸化ナトリウム（NaOH）濃度とAUCの相関性を示した。水酸化ナトリウム（NaOH）濃度が増加するにつれてAUC及びオーダーパラメーター（S）が増大したが、0.001～0.01MでAUC及びオーダーパラメーター（S）値はプラトーとなった。即ち、体内動態の保証された及び/又は予測された式（IV）で示されるリピッドA類縁体注射剤の溶解工程に使用した最適水酸化ナトリウム（NaOH）濃度は0.001～0.01Mであった。

実施例1

50mLのガラス製ビーカーに式（IV）で示されるリピッドA類縁体32.47mgを秤量し、これに0.01M-NaOHを7.5mL加えた。これに長さ2cmのスターラーバー

を入れ、室温にて60分間攪拌した（溶解工程に使用した水酸化ナトリウム（NaOH）濃度＝0.01M）。この溶液に、25mLの乳糖・リン酸緩衝液（25mL中に乳糖1水和物が500mg、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ が2.25mg、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ が1.75mgが溶解した水溶液）を加えた。スターラーにて5分間攪拌後、50mLのメスフラスコに全量を移し、注射用蒸留水を加えて50mLにメスアップした。この時の溶液のpHは7.39であった。

実施例 2

50mLのガラス製ビーカーに式（IV）で示されるリピッドA類縁体2.23mg秤量し、これに0.01M-NaOHを0.75mL、注射用蒸留水6.75mLを加えた。これに長さ2cmのスターラーバーを入れ、室温にて60分間攪拌した（溶解工程に使用した水酸化ナトリウム（NaOH）濃度＝0.01M×1/10）。この溶液に、25mLの乳糖・リン酸緩衝液（25mL中に乳糖1水和物が500mg、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ が2.25mg、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ が1.75mgが溶解した水溶液）を加えた。スターラーにて5分間攪拌後、50mLのメスフラスコに全量を移した。更にメスフラスコに6.75mLの0.01M-NaOHを加え混和した後、注射用蒸留水を加えて50mLにメスアップした。この時の溶液のpHは7.41であった。

実施例 3

50mLのガラス製ビーカーに式（IV）で示されるリピッドA類縁体32.13mg秤量し、これに0.01N-NaOHを0.25mL、注射用蒸留水7.25mLを加えた。これに長さ2cmのスターラーバーを入れ、室温にて60分間攪拌した（溶解工程に使用した水酸化ナトリウム（NaOH）濃度＝0.01M×1/30）。この溶液に、25mLの乳糖・リン酸緩衝液（25mL中に乳糖1水和物が500mg、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ が2.25mg、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ が1.75mgが溶解した水溶液）を加えた。スターラーにて5分間攪拌後、50mLのメスフラスコに全量を移した。更にメスフラスコに7.25mLの0.01M-NaOHを加え混和した後、注射用蒸留水を加えて50mLにメスアップした。この時の溶液のpHは7.42であった。

実施例 4

50mLのガラス製ビーカーに式（IV）で示されるリピッドA類縁体32.16mg秤

量し、これに 0.01M-NaOH を 0.125mL、注射用蒸留水 7.375mL を加えた。これに長さ 2cm のスターラーバーを入れ、室温にて 60 分間攪拌した（溶解工程に使用した水酸化ナトリウム（NaOH）濃度 = $0.01\text{M} \times 1/60$ ）。この溶液に、25mL の乳糖・リン酸緩衝液（25mL 中に乳糖 1 水和物が 500mg、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ が 2.25mg、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ が 1.75mg が溶解した水溶液）を加えた。スターラーにて 5 分間攪拌後、50mL のメスフラスコに全量に移した。更にメスフラスコに 7.375mL の 0.01M-NaOH を加え混和した後、注射用蒸留水を加えて 50mL にメスアップした。この時の溶液の pH は 7.30 であった。

実施例 5

50mL のガラス製ビーカーに式（IV）で示されるリピッド A 類縁体 32.63mg を秤量し、これに 0.01M-NaOH を 0.125mL、注射用蒸留水 7.375mL を加えた溶液を 5.0mL 加え更に注射用蒸留水 2.5mL を加えた。これに長さ 2cm のスターラーバーを入れ、室温にて 60 分間攪拌した（溶解工程に使用した水酸化ナトリウム（NaOH）濃度 = $0.01\text{M} \times 1/90$ ）。この溶液に、25mL の乳糖・リン酸緩衝液（25mL 中に乳糖 1 水和物が 500mg、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ が 2.25mg、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ が 1.75mg が溶解した水溶液）を加えた。スターラーにて 5 分間攪拌後、50mL のメスフラスコに全量に移した。更にメスフラスコに 7.4 mL の 0.01M-NaOH を加え混和し、更に 0.01M-NaOH を加えて pH を 7.4 に調整した後、注射用蒸留水を加えて 50mL にメスアップした。この時の溶液の pH は 7.42 であった。

実施例 6

50mL のガラス製ビーカーに式（IV）で示されるリピッド A 類縁体 32.07mg を秤量し、これに 0.01M-NaOH を 0.125mL、注射用蒸留水 7.375mL を加えた溶液を 3.75mL 加え更に注射用蒸留水 3.75mL を加えた。これに長さ 2cm のスターラーバーを入れ、室温にて 60 分間攪拌した（溶解工程に使用した水酸化ナトリウム（NaOH）濃度 = $0.01\text{M} \times 1/120$ ）。この溶液に、25mL の乳糖・リン酸緩衝液（25mL 中に乳糖 1 水和物が 500mg、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ が 2.25mg、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ が 1.75mg が溶解した水溶液）を加えた。スターラーにて 5 分間攪拌後、50mL のメスフラスコに全量に移した。更にメスフラスコに 7.4mL の 0.01N-NaOH を加え

混和し、更に 0.01M-NaOH を加えて pH を 7.4 に調整した後、注射用蒸留水を加えて 50mL にメスアップした。この時の溶液の pH は 7.48 であった。

実施例 7

50mL のガラス製ビーカーに式 (IV) で示されるリピッド A 類縁体 32.43mg を秤量した。これに 0.01M-NaOH を 0.125mL、注射用蒸留水 14.875mL を加えて混和した溶液を 5.0mL 加え更に注射用蒸留水 2.5mL を加えた。これに長さ 2cm のスターラーバーを入れ、室温にて 60 分間攪拌した（溶解工程に使用した水酸化ナトリウム (NaOH) 濃度 = $0.01\text{M} \times 1/180$ ）。この溶液に、25mL の乳糖・リン酸緩衝液（25mL 中に乳糖 1 水和物が 500mg、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ が 2.25mg、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ が 1.75mg が溶解した水溶液）を加えた。スターラーにて 5 分間攪拌後、50mL のメスフラスコに全量を移した。更にメスフラスコに 7.45mL の 0.01M-NaOH を加え混和し、更に 0.01M-NaOH を加えて pH を 7.4 に調整した後、注射用蒸留水を加えて 50mL にメスアップした。この時の溶液の pH は 7.41 であった。

実施例 8

50mL のガラス製ビーカーに式 (IV) で示されるリピッド A 類縁体 32.84mg を秤量した。これに 0.01M-NaOH を 0.125mL、注射用蒸留水 14.875mL を加えて混和した溶液を 3.75mL 加え更に注射用蒸留水 3.75mL を加えた。これに長さ 2cm のスターラーバーを入れ、室温にて 60 分間攪拌した（溶解工程に使用した水酸化ナトリウム (NaOH) 濃度 = $0.01\text{M} \times 1/240$ ）。この溶液に、25mL の乳糖・リン酸緩衝液（25mL 中に乳糖 1 水和物が 500mg、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ が 2.25mg、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ が 1.75mg が溶解した水溶液）を加えた。スターラーにて 5 分間攪拌後、50mL のメスフラスコに全量を移した。更にメスフラスコに 7.45mL の 0.01M-NaOH を加え混和し、更に 0.01M-NaOH を加えて pH を 7.4 に調整した後、注射用蒸留水を加えて 50mL にメスアップした。この時の溶液の pH は 7.41 であった。

実施例 9

50mL のガラス製ビーカーに式 (IV) で示されるリピッド A 類縁体 32.35mg を秤量した。これに 0.01M-NaOH を 0.25mL、注射用蒸留水 7.25mL を加えて混和した溶液を 0.75mL 加え更に注射用蒸留水 6.75mL を加えた。これに長さ 2cm のスタ

スターラーバーを入れ、室温にて60分間攪拌した（溶解工程に使用した水酸化ナトリウム（NaOH）濃度＝0.01M×1/350）。この溶液に、25mLの乳糖・リン酸緩衝液（25mL中に乳糖1水和物が500mg、Na₂HPO₄・7H₂Oが2.25mg、NaH₂PO₄・H₂Oが1.75mgが溶解した水溶液）を加えた。スターラーにて5分間攪拌後、50mLのメスフラスコに全量に移した。更にメスフラスコに7.45mLの0.01M-NaOHを加え混和し、更に0.01M-NaOHを加えてpHを7.4に調整した後、注射用蒸留水を加えて50mLにメスアップした。この時の溶液のpHは7.41であった。

実施例 10

50mLのガラス製ビーカーに式（IV）で示されるリピッドA類縁体32.97mgを秤量した。これに0.01M-NaOHを0.25mL、注射用蒸留水7.25mLを加えて混和した溶液を0.5mL加え更に注射用蒸留水7.0mLを加えた。これに長さ2cmのスターラーバーを入れ、室温にて60分間攪拌した（溶解工程に使用した水酸化ナトリウム（NaOH）濃度＝0.01M×1/450）。この溶液に、25mLの乳糖・リン酸緩衝液（25mL中に乳糖1水和物が500mg、Na₂HPO₄・7H₂Oが2.25mg、NaH₂PO₄・H₂Oが1.75mgが溶解した水溶液）を加えた。スターラーにて5分間攪拌後、50mLのメスフラスコに全量に移した。更にメスフラスコに7.45mLの0.01M-NaOHを加え混和し、更に0.01M-NaOHを加えてpHを7.4に調整した後、注射用蒸留水を加えて50mLにメスアップした。この時の溶液のpHは7.43であった。

表 1

リピッドA類縁体含有注射用製剤の物理化学的パラメーターとラット投与時のAUC (0-2hr)

実施例	溶解工程における 水酸化ナトリウム濃度 (M)	AUC (0-2hr) (ng·hr/ml)	CD強度	オーダーパラメーター (S)
実施例 1	0.01	7377±261	-14.1	0.499
実施例 2	0.01×1/10	7465±276	-13.9	0.491
実施例 3	0.01×1/30	6231±318	-17.7	0.540
実施例 4	0.01×1/60	5817±117	-18.6	0.553
実施例 5	0.01×1/90	5158±173	-20.5	0.584
実施例 6	0.01×1/120	5078±290	-22.1	0.595
実施例 7	0.01×1/180	4388±358	-22.3	0.608
実施例 8	0.01×1/240	1665±106	-24.5	0.650
実施例 9	0.01×1/300	3858±255	-23.1	0.624
実施例 10	0.01×1/450	-	-21.9	0.616

AUC: 平均値±標準偏差

下記に示す実施例 11 ~ 21 は、式 (III) で示されるリピッド A 類縁体を含有する注射用製剤を調製する際の溶解工程において、実施例 11 ~ 16 では室温攪拌を、実施例 17 ~ 21 では超音波分散 (10℃以下) を行ったものである。式 (III) で示されるリピッド A 類縁体法の相転移温度は約 30℃であるため、実施例 11 ~ 21 では十分な溶解分散が得られず、表 2 に示すように、ラット投与時の AUC およびオーダーパラメーター (S) を初めとする物理化学的パラメーターのばらつきが大きく認められた。

実施例 11 ~ 16

ガラス製ビーカーに、式 (III) で示されるリピッド A 類縁体 100mg を秤量した。これに 0.01M-NaOH を 50mL 添加し、室温 (約 25℃) でスターラー攪拌した。この溶液に、600mL の乳糖・リン酸緩衝液 (注射用蒸留水 600mL 中に乳糖 1 水和物 100g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.45g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.35g を溶解した水溶液) を加えスターラー攪拌後に、注射用蒸留水を適量加えて 1L にメスアップした。この薬液を 0.22 μm フィルターでろ過した後に、そのろ液 5.3ml ずつをバイアルに充填し、凍結乾燥を行なった。この注射用凍結乾燥製剤バイアルに、注射用蒸留水 5mL を加えて復水し、ラット体内動態 (AUC)、粒子径、膜流動性 (オーダーパラメーター (S)、蛍光異方性 r 、蛍光偏光度 P) を評価した結果を、表 2 に示した。

実施例 17 ~ 21

ガラス製ビーカーに、式 (III) で示されるリピッド A 類縁体 100mg を秤量した。これに 0.01M-NaOH を 150mL 添加し、室温でスターラー攪拌した。式 (III) で示されるリピッド A 類縁体によるゲルがなくなったことを目視で確認後に、ガラス製ビーカーをバスタイプソニケーター中で 10℃以下を維持しながら超音波照射を行った。この溶液に、600mL の乳糖・リン酸緩衝液 (注射用蒸留水 600mL 中に乳糖 1 水和物 100g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.45g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.35g を溶解した水溶液) を加えスターラー攪拌後に、注射用蒸留水を適量加えて 1L にメスアップした。この薬液を 0.22 μm フィルターでろ過した後に、そのろ液 5.3ml ずつをバイアルに充填し、凍結乾燥を行なった。この注射用凍結乾燥製剤バイアル

に、注射用蒸留水 5mL を加えて復水し、ラット体内動態 (AUC)、粒子径、膜流動性 (オーダーパラメーター (S)、蛍光異方性 r 、蛍光偏向度 P) を評価した結果を、表 2 に示した。

表 2

リピッドA類縁体含有注射用製剤(500 μ g/バイアル瓶)の物理化学的パラメーターとラット投与時のAUC (0-2hr)

実施例	溶解工程における 水酸化ナトリウム濃度 (M)	分散法	AUC (0-2hr) (ng·hr/ml)	粒子径 (nm)	蛍光異方性 (r)	蛍光偏光度 (p)	オーダーパラメーター (S)
実施例11	0.01	加熱攪拌法	2762	33.0 \pm 9.9	0.215	0.291	0.735
実施例12	0.01	加熱攪拌法	1130	40.1 \pm 13.0	0.23	0.310	0.760
実施例13	0.01	加熱攪拌法	624	60.9 \pm 16.9	0.242	0.324	0.780
実施例14	0.01	加熱攪拌法	2007	30.7 \pm 11.3	0.201	0.274	0.711
実施例15	0.01	加熱攪拌法	5921	18.0 \pm 10.9	0.151	0.210	0.616
実施例16	0.01	加熱攪拌法	359	32.6 \pm 13.2	0.237	0.318	0.772
実施例17	0.01	超音波分散法	5300	16.8 \pm 5.3	0.178	0.245	0.669
実施例18	0.01	超音波分散法	2211	18.1 \pm 5.2	0.203	0.276	0.714
実施例19	0.01	超音波分散法	2229	16.1 \pm 6.4	0.209	0.284	0.725
実施例20	0.01	超音波分散法	2327	17.0 \pm 5.1	0.193	0.264	0.696
実施例21	0.01	超音波分散法	2386	34.6 \pm 11.9	0.213	0.289	0.732

粒子径: 平均値 \pm 標準偏差

実施例 22 ～ 26

ガラス製ビーカーに式 (III) で示されるリピッド A 類縁体 100mg を秤量した。これに 0.003M-NaOH を 50mL 添加し、 $50 \pm 5^{\circ}\text{C}$ でスターラー攪拌した。尚、スターラー攪拌時間は、3, 8, 15, 30, 90 分間と変化させた。攪拌後の溶液に、600mL の乳糖・リン酸緩衝液（注射用蒸留水 600mL 中に乳糖 1 水和物 100g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.45g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.35g を溶解した水溶液）を加えスターラー攪拌後に、注射用蒸留水を適量加えて 1L にメスアップした。この薬液を $0.22 \mu\text{m}$ フィルターでろ過した後に、そのろ液 5.3ml ずつをバイアルに充填し、凍結乾燥を行なった。この注射用凍結乾燥製剤バイアルに、注射用蒸留水 5mL を加えて復水し、ラット体内動態 (AUC)、粒子径、膜流動性 (オーダーパラメーター (S))、表面荷電を評価した結果を、表 3 に示した。式 (III) で示されるリピッド A 類縁体の相転移温度（約 30°C ）以上の温度（ $50 \pm 5^{\circ}\text{C}$ ）の水酸化ナトリウム溶液中での攪拌を行ったため、AUC は攪拌時間に依存し、攪拌時間が長くなるほど AUC の増加が認められた。また、AUC が大きくなるほどオーダーパラメーター (S) が小さくなった。更に、粒子径や表面荷電に関しては、AUC との明確な相関は認められなかった。

表 3

リピッド A 類縁体含有注射用製剤 ($500 \mu\text{g}$ /バイアル瓶) の物理化学的パラメーターとラット投与時の AUC (0-2hr) に及ぼす水酸化ナトリウム中の攪拌時間の影響

実施例	0.003M NaOH 中の 攪拌時間 (分)	分散法	AUC (0-2hr) (ng·hr/ml)	粒子径 (nm)	表面荷電 (ゼータ電位: mV)	オーダーパラメーター (S)
実施例 22	3	加熱攪拌法	1362	29.0 ± 14.0	0.215	0.759
実施例 23	8	加熱攪拌法	5668	18.4 ± 6.8	0.23	0.721
実施例 24	15	加熱攪拌法	7333	16.5 ± 6.0	0.242	0.695
実施例 25	30	加熱攪拌法	8051	15.3 ± 5.0	0.201	0.661
実施例 26	90	加熱攪拌法	9381	16.7 ± 5.3	0.151	0.636

粒子径: 平均値 \pm 標準偏差

実施例 27

ガラス製ビーカーに式 (III) で示されるリピッド A 類縁体 100mg を秤量した。これに 0.003M-NaOH を 50mL 添加し、 $50 \pm 5^{\circ}\text{C}$ で 30 分間のスターラー攪拌を行った。攪拌後の溶液に、600mL の乳糖・リン酸緩衝液（注射用蒸留水 600mL 中

に乳糖 1 水和物 100g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.45g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.35g を溶解した水溶液) を加えスターラー攪拌後に、注射用蒸留水を適量加えて 1L にメスアップした。この薬液を $0.22 \mu\text{m}$ フィルターでろ過した後に、そのろ液 5.3ml ずつをバイアルに充填し、凍結乾燥を行なった。この製造初期品と $40^\circ\text{C} - 75\%$ 相対湿度下での安定性試験品 (1 ヶ月、2 ヶ月、3 ヶ月の保存後の注射用凍結乾燥製剤) について、例数 $n=3$ で各々注射用蒸留水 5mL を加えて復水し、膜流動性 (オーダーパラメーター (S)) を評価した。その結果を表 4 に示した。オーダーパラメーター (S) の測定時の変動は小さく、十分な再現性が確認された。また、初期～3 ヶ月安定性試験品の間では、オーダーパラメーター (S) 及び体内動態の変化は認められず、安定な注射用製剤であることが明らかになった。

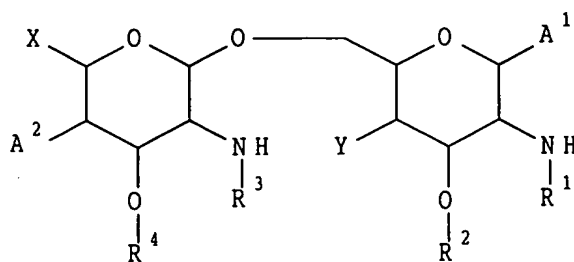
表 4

リピッドA類縁体含有注射用製剤 (500 μg /バイアル瓶) の安定性試験における
オーダーパラメーター (S) の変化と再現性

測定回数 n	初期	1M ($40^\circ\text{C} - 75\%\text{R.H.}$)	2M ($40^\circ\text{C} - 75\%\text{R.H.}$)	3M ($40^\circ\text{C} - 75\%\text{R.H.}$)
1	0.560	0.589	0.572	0.597
2	0.586	0.565	0.589	0.576
3	0.599	0.599	0.591	0.591
平均値	0.584	0.584	0.588	0.588
CV (%)	3.40	2.99	1.78	1.84

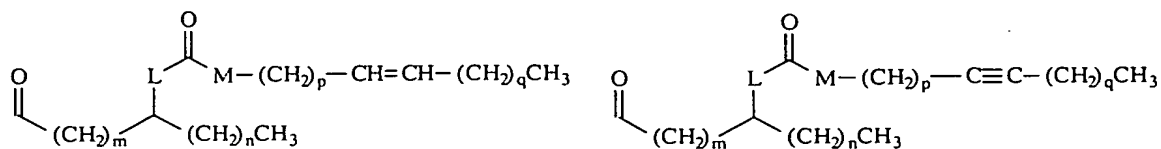
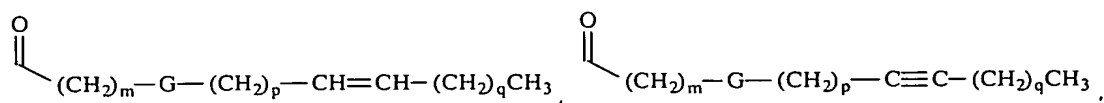
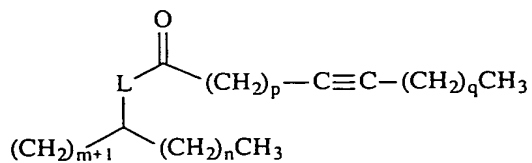
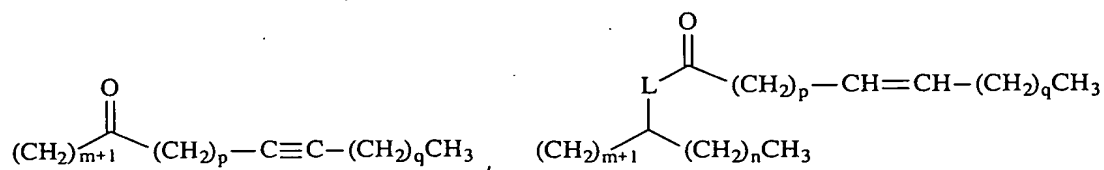
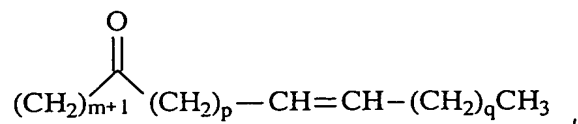
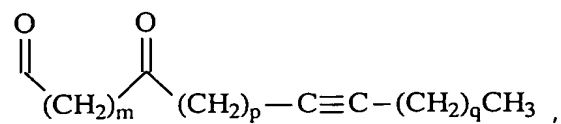
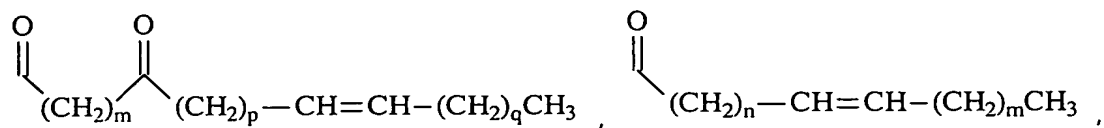
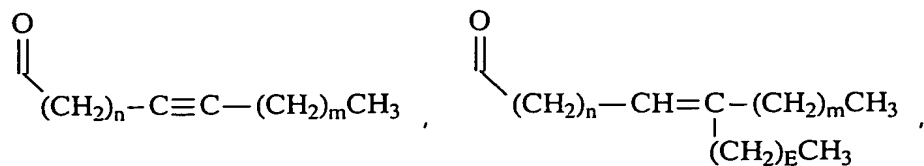
請求の範囲

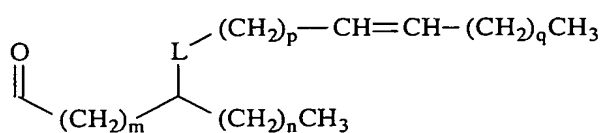
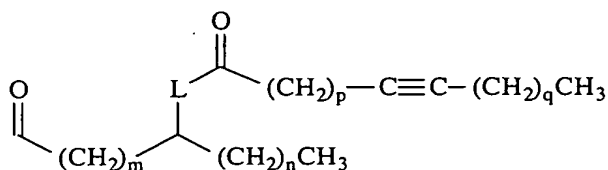
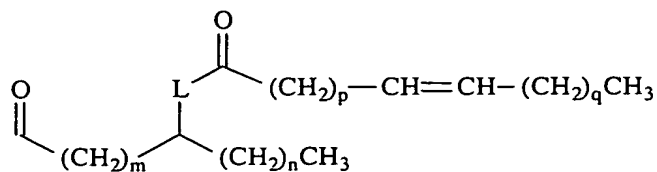
1. リピッド A 類縁体またはその薬理学的に許容できる塩を含有する注射用製剤において、膜流動性及び/又は円偏光性を測定することを特徴とするリピッド A 類縁体の体内動態の予測方法。
2. 注射用製剤を評価するために行う請求項 1 に記載した予測方法。
3. 一定の体内動態を示す注射用製剤を得るための品質評価に用いる請求項 1 に記載した予測方法。
4. 注射用製剤の製造工程において行う請求項 1 に記載した予測方法。
5. 膜流動性の測定法が、オーダーパラメーター (S) 及び/又は蛍光偏光度 (P) 及び/又は蛍光異方性 (r) をパラメーターとする蛍光プローブ法である請求項 1 に記載した予測方法。
6. 注射用製剤は、リピッド A 類縁体またはその薬理学的に許容できる塩をアルカリ性水溶液に溶解し、次いで緩衝液を添加して製造され、直径 30 nm 以下の会合体を含有する請求項 1 に記載した予測方法。
7. 注射用製剤が、水性注射剤又は凍結乾燥製剤である請求項 1 に記載した予測方法。
8. リピッド A 類縁体またはその薬理学的に許容できる塩が、次式 (I) で表される化合物またはその薬理学的に許容できる塩である請求項 1 に記載した予測方法。



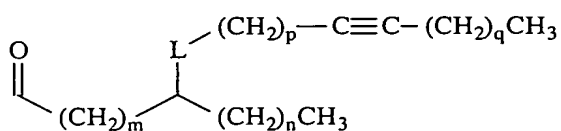
(I)

式中、R¹、R²、R³又はR⁴の少なくとも一つは、

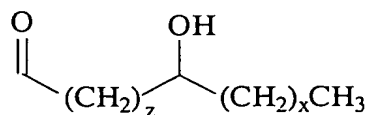
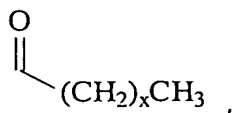


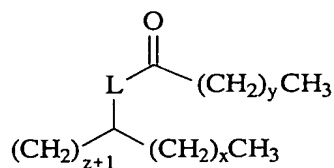
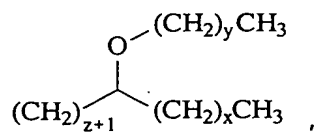
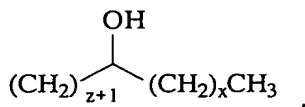
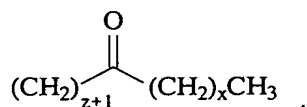
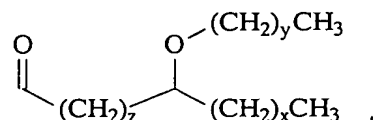
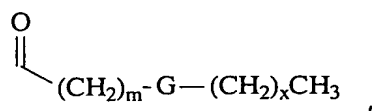
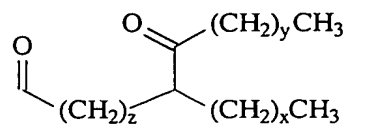
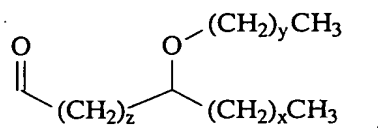
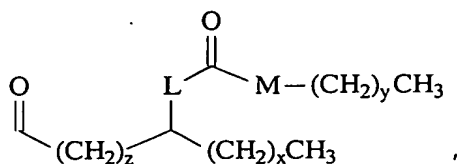
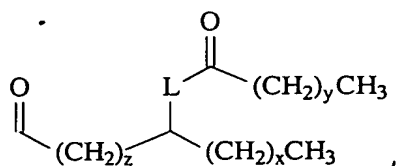


又は

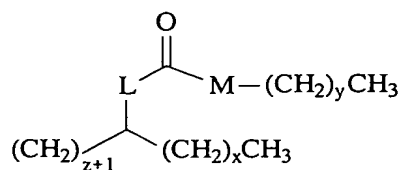


(式中、各LはO、N又はCであり；各MはO又はNであり；各Eは、独立して0から14までの整数であり；各Gは、独立してN、O、S、SO又はSO₂であり；各mは、独立して0から14までの整数であり；各nは、独立して、0から14までの整数であり；各pは独立して0から10までの整数であり；各qは、独立して0から10までの整数である)であり；
残りのR¹、R²、R³及びR⁴の各々は、独立して、

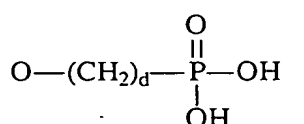
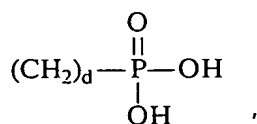
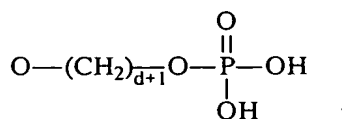
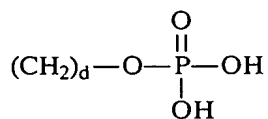


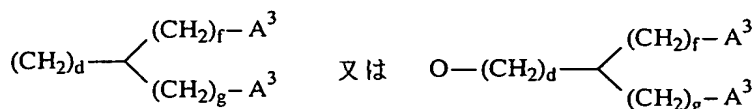
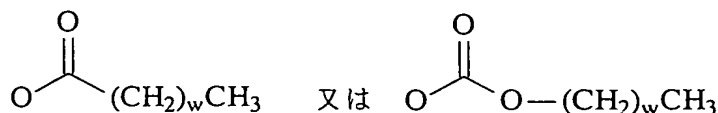
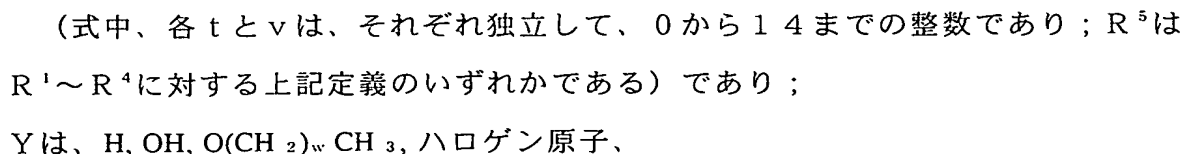
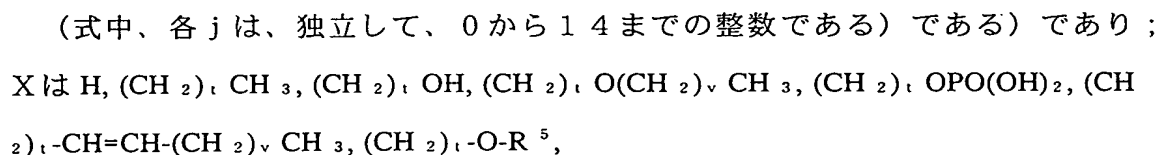


又は



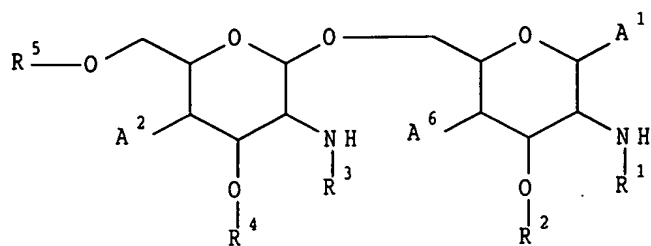
(式中、各LはO、N又はCであり；各MはO又はNであり；各xは、独立して、0から14までの整数であり；各yは、独立して、0から14までの整数であり；各zは、独立して0から10までの整数であり；各Gは、独立して、N、O、S、SO又はSO₂である)であり；
各A¹とA²は、独立して、H、OH、OCH₃、




$$\begin{array}{cc} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ (\text{CH}_2)_j - \text{O} - \text{P} - \text{OH} \\ | \\ \text{OH} \end{array} & , \quad \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{O} - (\text{CH}_2)_{j+1} - \text{O} - \text{P} - \text{OH} \\ | \\ \text{OH} \end{array} \\ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ (\text{CH}_2)_j - \text{P} - \text{OH} \\ | \\ \text{OH} \end{array} & , \quad \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{O} - (\text{CH}_2)_j - \text{P} - \text{OH} \\ | \\ \text{OH} \end{array} \end{array}$$


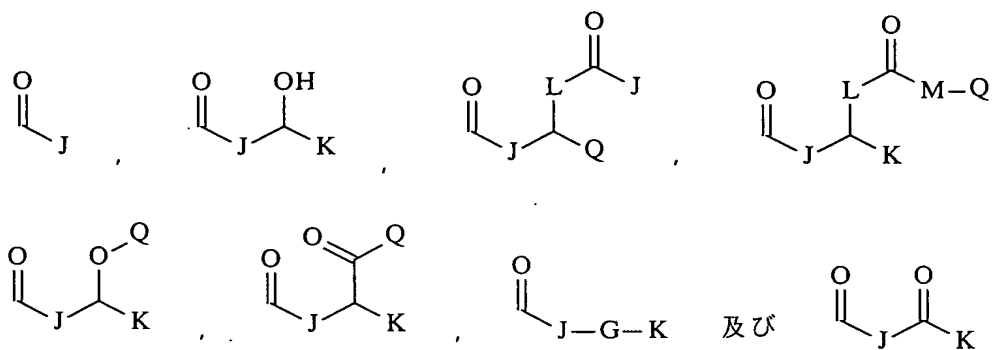
34

9. リピッドA類縁体またはその薬理学的に許容できる塩が、次式(II)で表される化合物またはその薬理学的に許容できる塩である請求項1に記載した予測方法。



(II)

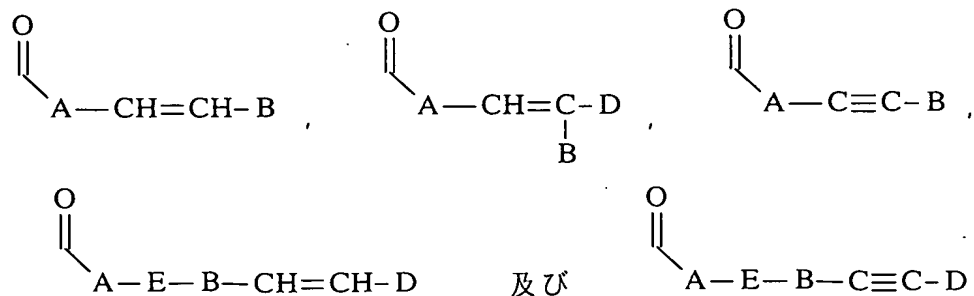
式中R¹は



(式中、J、K及びQは、それぞれ直鎖又は分枝の炭素数1～15のアルキル基であり、LはO、NH₂又はCH₂であり、MはO又はNHであり、GはNH、O、S、SO又はSO₂である)から成る群から選ばれる基であり；

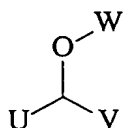
R²は直鎖又は分枝状の炭素数5～15のアルキル基であり；

R³は、



(式中、Eは、N、O、S、SO又はSO₂であり、A、B及びDは、それぞれ直鎖又は分枝の炭素数1～15のアルキル基である) からなる群から選ばれる基であり；

R⁴は直鎖又は分枝の炭素数4～20のアルキル基、及び

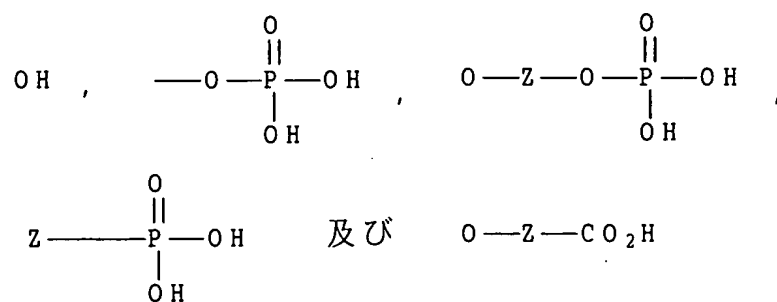


(式中、U及びVは、それぞれ直鎖又は分枝の炭素数2～15のアルキル基であり、Wは水素原子、あるいは直鎖又は分枝の炭素数1～5のアルキル基である) からなる群から選ばれる基であり；

R⁵は水素原子、J'、-J'-OH、-J'-O-K'、-J'-O-K'-OH及び-J'-O-PO(OH)₂(式中J'及びK'は、それぞれ直鎖又は分枝の炭素数1～5のアルキル基である) から選ばれる基であり；

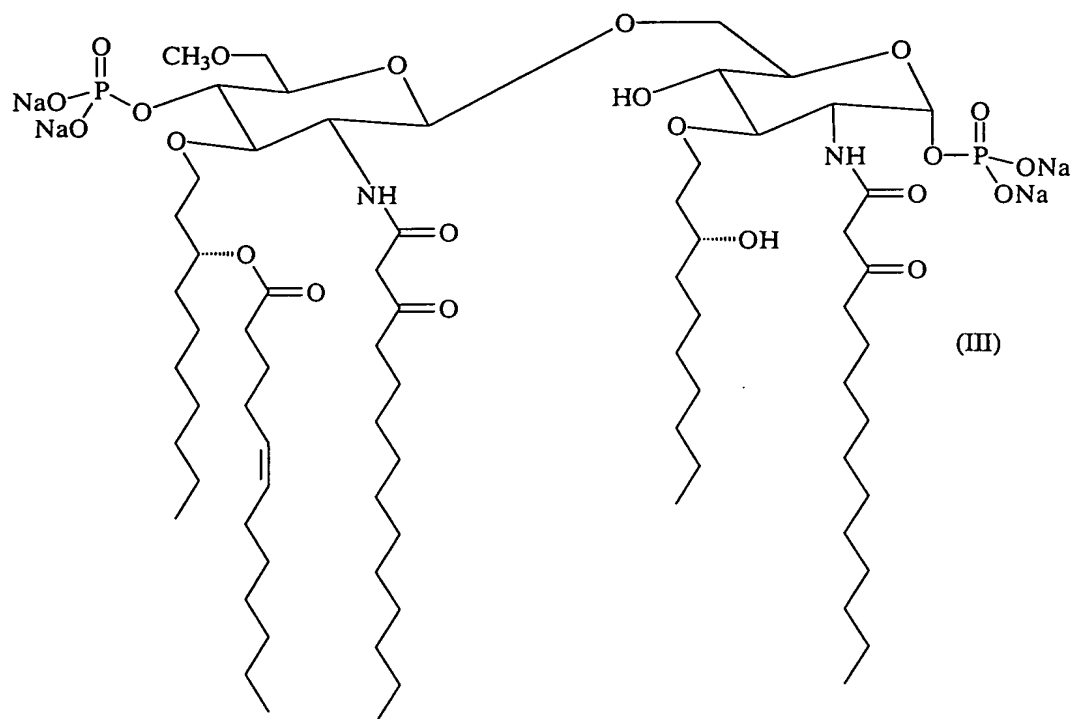
R⁶は水酸基、ハロゲン原子、炭素数1～5のアルコキシ基及び炭素数1～5のアシルオキシ基からなる群から選ばれる基であり；

A¹及びA²は、それぞれ独立して、

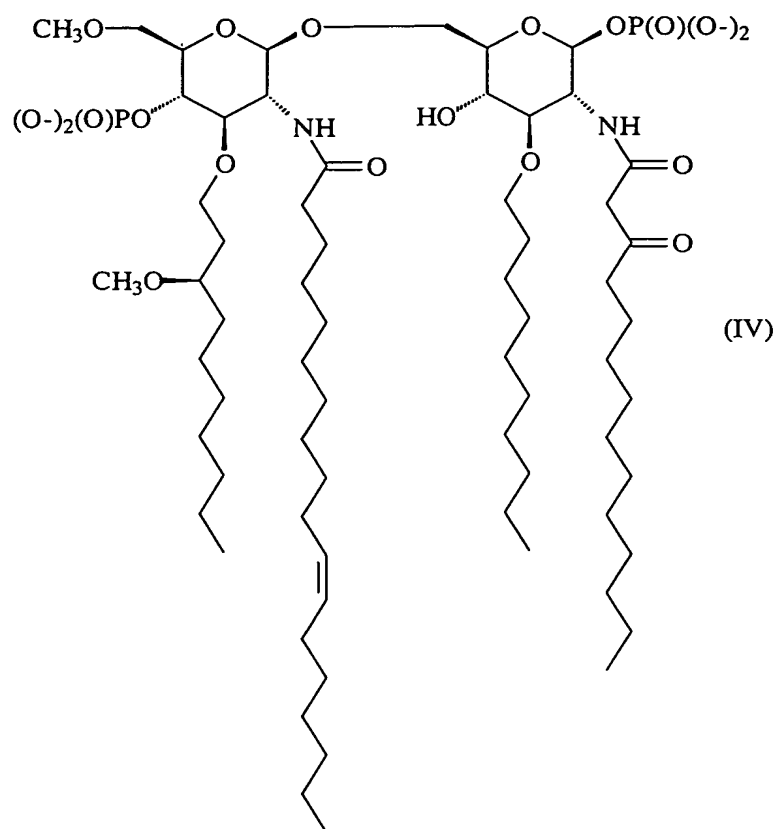


(式中、Zは直鎖又は分枝の炭素数1～10のアルキル基である) からなる群から選ばれる基である。

10. リピッド A 類縁体が次式 (III) で表される化合物である請求項 1 に記載した予測方法。



11. リピッドA類縁体が次式 (IV) で表される化合物である請求項1に記載した予測方法。



12. リピッドA類縁体またはその薬理学的に許容できる塩が、脂質二分子膜小胞体またはミセルの会合体構造を有している請求項1に記載した予測方法。

要約書

本発明は、リピッドA類縁体含有注射剤の評価方法及び製造方法を提供する。
すなわち、リピッドA類縁体またはその薬理学的に許容できる塩を含有する注射
用製剤において、膜流動性及び／又は円偏光性を測定することを特徴とするリピ
ッドA類縁体の体内動態の予測方法、評価方法、注射剤の品質評価法又は製造方
法を提供する。

図 1

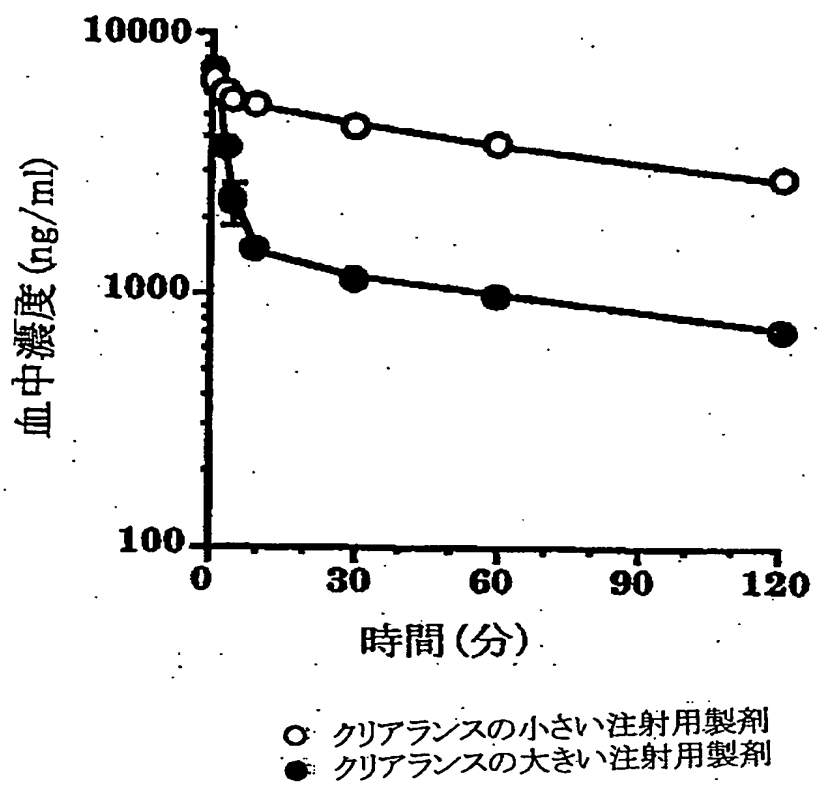


図 2

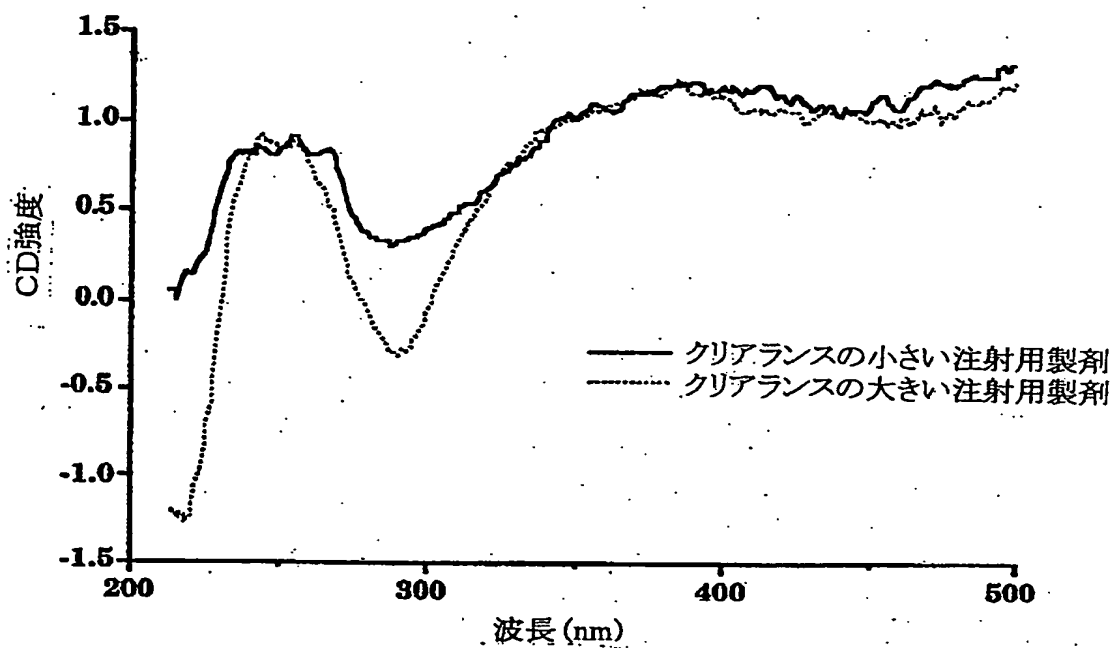


図 3

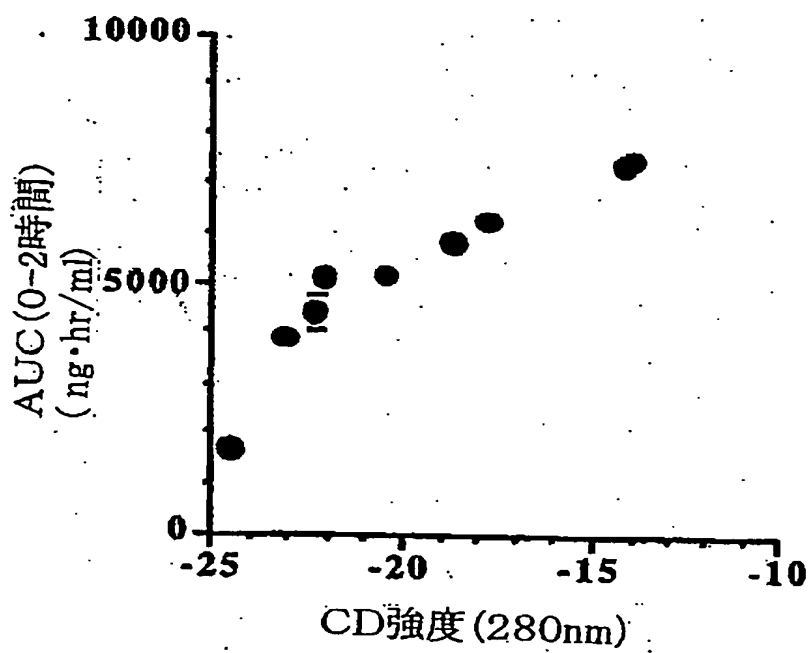


図 4

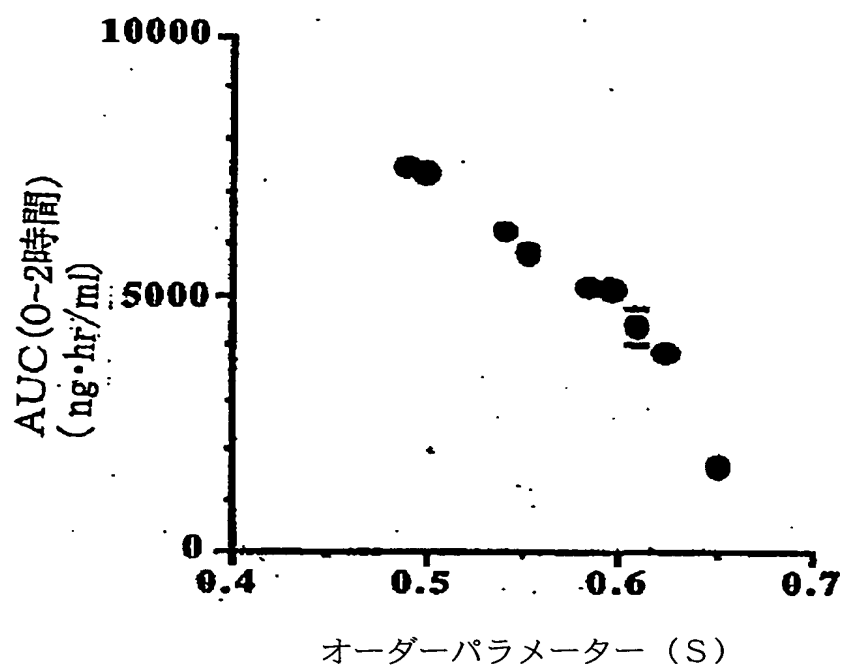


図 5

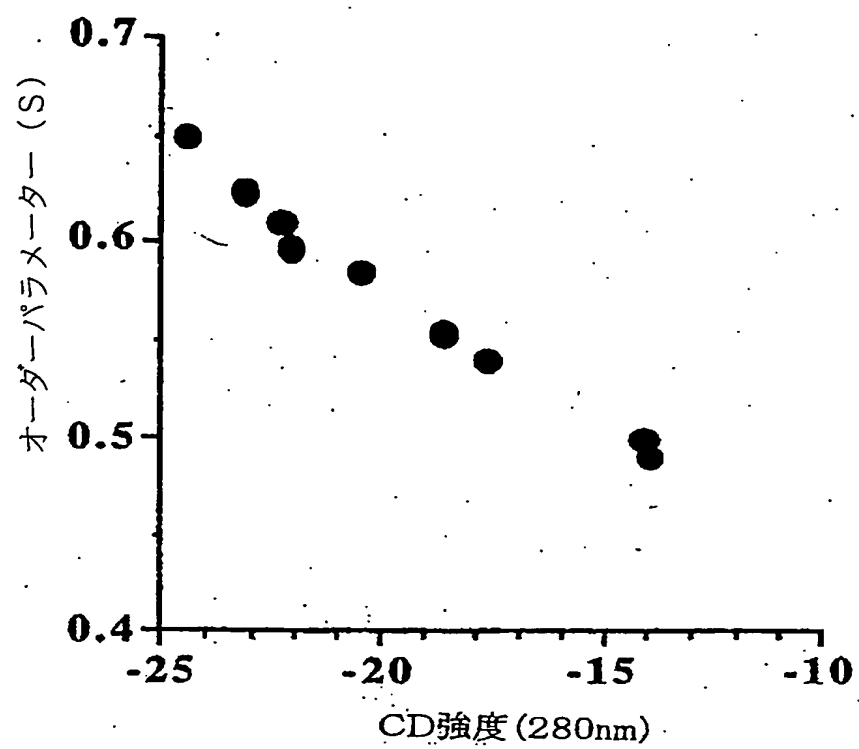


図 6

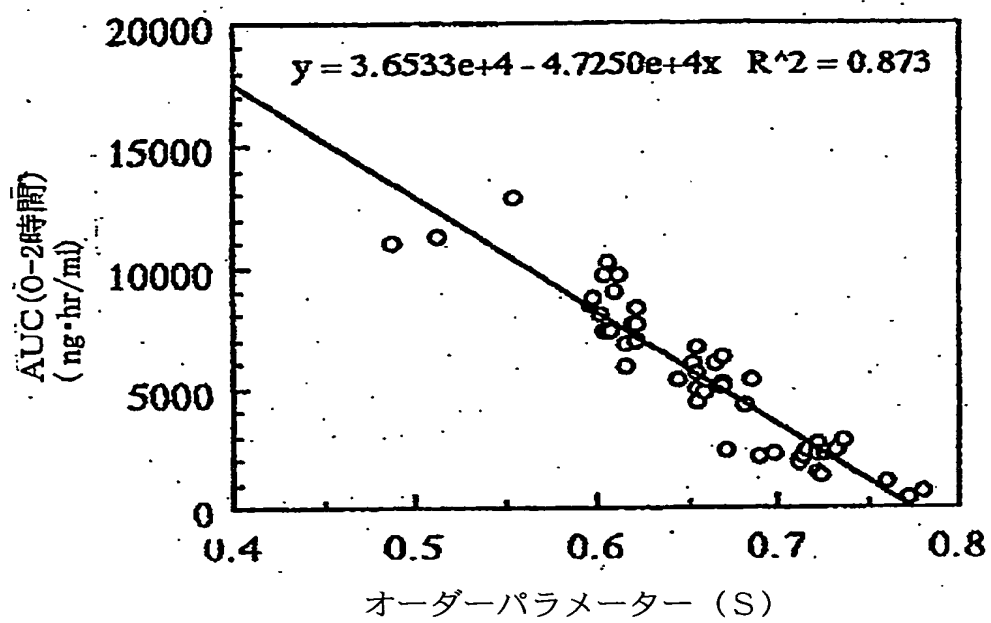


図 7

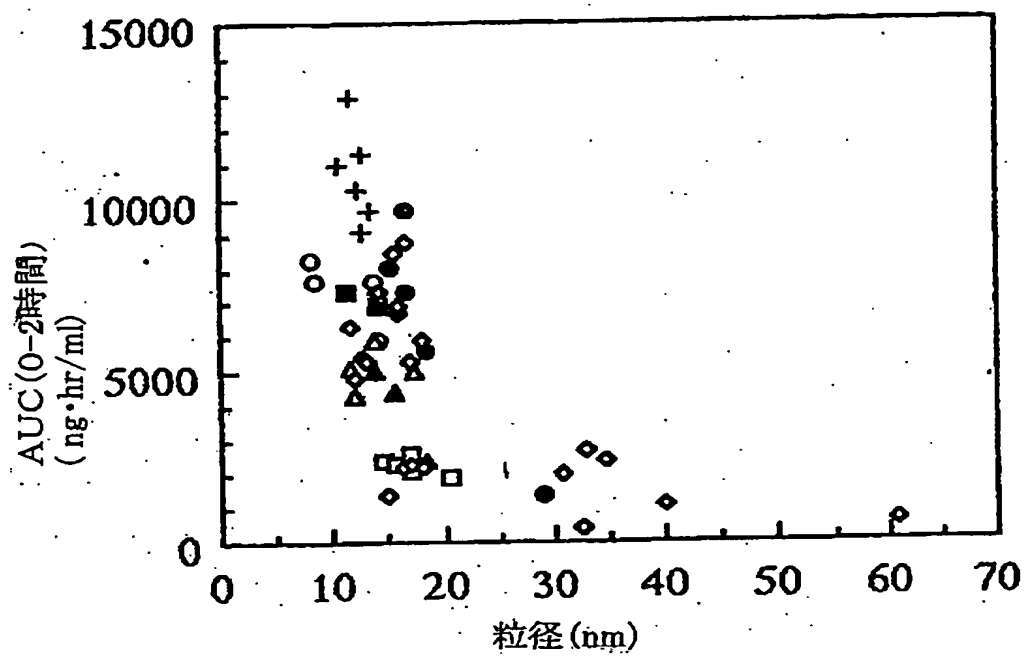
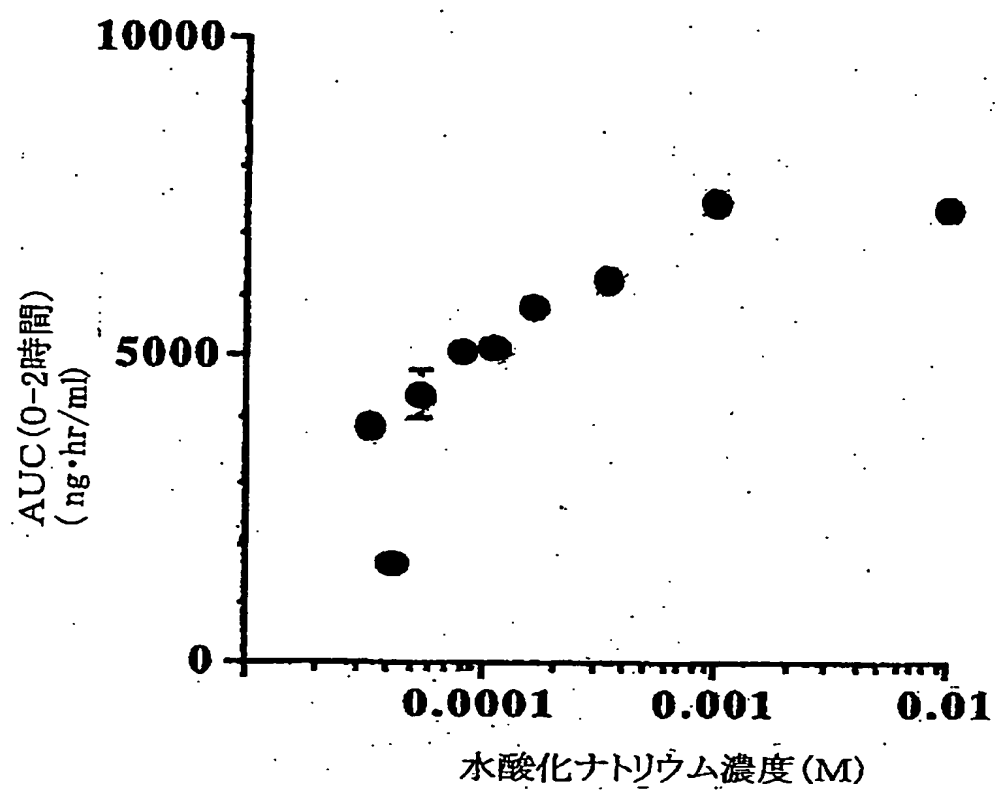


図 8



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national application No.

PCT/JP99/04615

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁶ G01N33/92, 33/15

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁶ G01N33/92, 33/15Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-1999
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-1999 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-1999Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JOIS [(RippidoA+ShishitsuA) * (Maku Ryuudou+En Henkou)]

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 62-129292, A (Toho Yakuhin Kogyo K.K.), 11 June, 1987 (11. 06. 87) & US, 4746742, A	1-12
A	JP, 62-252795, A (Daikin Industries, Ltd.), 4 November, 1987 (04. 11. 87) (Family: none)	1-12
A	JP, 4-198192, A (Japan Tobacco Inc.), 17 July, 1992 (17. 07. 92) (Family: none)	1-12

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
15 October, 1999 (15. 10. 99)Date of mailing of the international search report
26 October, 1999 (26. 10. 99)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

4T

特 許 協 力 条 約

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

REC'D 01 MAY 2000

WIPO

PCT

出願人又は代理人 の書類記号 99032PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 99/04615	国際出願日 (日.月.年) 26.08.99	優先日 (日.月.年) 01.09.98
国際特許分類(IPC) Int. Cl ⁷ G01N33/92, 33/15		
出願人(氏名又は名称) エーザイ株式会社		

- 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
- この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。
☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で _____ ページである。
- この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
 - ☒ 国際予備審査報告の基礎
 - ☐ 優先権
 - ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
 - ☐ 発明の単一性の欠如
 - ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
 - ☐ ある種の引用文献
 - ☐ 国際出願の不備
 - ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 15.02.00	国際予備審査報告を作成した日 13.04.00		
名称及びあて先 日本国特許庁-(I-P-E-A/J-P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員)	2 J	9015
	亀田宏之 印		
	電話番号 03-3581-1101 内線 3252		

様式PCT/IPEA/409(表紙)(1998年7月)

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)

請求の範囲

1~12

有

請求の範囲

無

進歩性(I S)

請求の範囲

1~12

有

請求の範囲

無

産業上の利用可能性(I A)

請求の範囲

1~12

有

請求の範囲

無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

リピッドA類縁体の膜流動性及び／又は円偏光性を測定して、体内動態を予測することは国際調査報告に列記されたいずれの文献にも記載されておらず、当業者にとって自明でもない。



PCT

特 許 協 力 条 約

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 99032PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/04615	国際出願日 (日.月.年) 26.08.99	優先日 (日.月.年) 01.09.98
出願人(氏名又は名称) エーザイ株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☐ 出願人が提出したものを承認する。

☒ 次に示すように国際調査機関が作成した。
リビッドA類縁体含有注射剤の評価方法

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 6 図とする。 ☒ 出願人が示したとおりである。

☐ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl.⁸ G01N33/92, 33/15

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl.⁸ G01N33/92, 33/15

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-1999年
日本国登録実用新案公報	1994-1999年
日本国実用新案登録公報	1996-1999年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
JOIS【(リピッドA+脂質A)* (膜流動+円偏光)】

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	J.P., 62-129292, A (東宝薬品工業株式会社) 11. 6月. 1987 (11. 06. 87) &US, 4746742, A	1~12
A	J.P., 62-252795, A (ダイキン工業株式会社) 4. 11月. 1987 (04. 11. 87) (ファミリーなし)	1~12
A	J.P., 4-198192, A (日本たばこ産業株式会社) 17. 7月. 1992 (17. 07. 92) (ファミリーなし)	1~12

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
15. 10. 99

国際調査報告の発送日
26.10.99

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
亀田 宏之



2 J 9015

電話番号 03-3581-1101 内線 9015